



ACTA PATHOLOGICA ET MICROBIOLOGICA  
SCANDINAVICA  
VOL. XX



# ACTA PATHOLOGICA ET MICROBIOLOGICA SCANDINAVICA

## REDACTORES

J. FORSSMAN LUND	H. HOLTH OSLO	K. A. JENSEN KØBENHAVN
POUL MØLLER KØBENHAVN	OSV. RENKONEN HELSINGFORS	E. SJÖVALL LUND
GEORG WAALER OSLO	AXEL WALLGREN HELSINGFORS	

## REDIGENDA CURAVIT

TAGE KEMP  
KØBENHAVN

---

## COLLABORANT

H. BERGSTRAND Stockholm	HARRY CASTRÉN Helsingfors	M. CHRISTIANSEN København	R. FÄHRAEUS Uppsala	A. F. FOLGER København
	F. HENSCHEN Stockholm	C. KLING Stockholm	L. KREYBERG Oslo	
TH. MADSEN København	J. A. MURTO Helsingfors	C. NYBERG Helsingfors	A. PETTERSON Stockholm	TH. M. VOGELSANO Bergen



VOL. XX.

FASC. 4. 1943.

EINAR MUNKSGAARD · KØBENHAVN

MCMXLIII



2019年12月10日

2019年12月10日

## ÜBER DIE WIRKUNG VON SULFONAMID-PRÄPARATEN AUF SALMONELLA-, DYSENTERIE- UND COLI-BAKTERIEN.

Von F. Kauffmann und K. Schmith.

(Eingegangen bei der Redaktion am 5. Feb. 1942).

Die umfangreichen Untersuchungen der letzten 4—5 Jahre über die Wirkung von Sulfonamid-Präparaten haben ergeben, dass diese Stoffe auf eine Reihe von Bakterien, wie Pneumokokken, Gonokokken, Meningokokken, Streptokokken u. a. hemmend wirken und in der Behandlung der durch diese Erreger bedingten Infektionen eine grosse Rolle spielen. Dagegen wurden bisher nur wenige experimentelle und klinische Arbeiten über die Wirkung dieser Substanzen auf Bakterien der Salmonella-Gruppe oder verwandter Gruppen veröffentlicht. In der vorliegenden Arbeit sollen die Ergebnisse experimenteller Untersuchungen über die Wirkung von Sulfapyridin, Sulfaguanidin und Sulfathiazol auf Salmonella-, Dysenterie- und Coli-Bakterien mitgeteilt werden. Bevor wir aber auf diese Untersuchungen näher eingehen, wollen wir die bisher vorliegenden Befunde, soweit sie in diesem Zusammenhang von Interesse sind, kurz referieren.

E. A. Bliss und P. H. Long zeigten, dass Sulfanilamid und Sulfapyridin das Wachstum verschiedener Bakterien (z. B. Typhus- und Coli-Bakterien) in Bouillon hemmen, wobei sich das Sulfapyridin als überlegen erwies. G. Melton und A. Beck fanden ebenso eine starke bakteriostatische Wirkung von Sulfapyridin auf Coli-Bakterien und



A. R. Frisk untersuchte das pharmakologische Verhalten von Sulfaguanidin im Menschen und berichtete über einige in vitro-Versuche, aus denen hervorging, dass Sulfaguanidin gegen Coli-Bakterien weniger wirksam war als Sulfapyridin und Sulfathiazol.

Schliesslich hat vor kurzem G. Ivánovics in seiner Arbeit über den Wirkungsmechanismus von Sulfonamid-Präparaten einige Versuche mit Coli-, Dysenterie- und Typhus-Bakterien mitgeteilt.

## EIGENE VERSUCHE.

### I. Reagenzglas-Versuche.

Es wurden folgende Präparate der Sulfonamid-Gruppe benutzt:

1. Sulfapyridin (M. & B. 693),
2. Sulfaguanidin,
3. Sulfathiazol.

Diese Substanzen wurden in Bouillon ohne Pepton gelöst, nachdem in einem Vorversuche festgestellt war, dass die Anwesenheit von Pepton — wie bereits aus der Literatur bekannt — die Wirkung dieser Präparate mehr oder weniger hemmt. Die von uns benutzte Fleischwasser-Bouillon hatte folgende Zusammensetzung:

Rindfleisch	500 g
NaCl	3 g
Sekund. Natriumphosphat ( $12\text{H}_2\text{O}$ )	2 g
Leitungswasser	1000 ccm

pH 7,3—7,4

Zu den ersten Versuchen wurden die Präparate in folgenden Verdünnungen der Bouillon zugesetzt: 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:10000, 1:20000, 1:40000, 1:80000, 1:160000 und 1:320000. Später, als wir nur mit Sulfathiazol arbeiteten, wandten wir folgende Verdünnungen an: 1:2500, 1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:40000, 1:80000, 1:160000, 1:320000, 1:640000 und 1:1280000. Die einzelnen Verdünnungen wurden auf Reagenzgläser à 5 ccm Inhalt abgefüllt und im Eisschranke vorrätig gehalten.

Die Beimpfung der Röhrchen erfolgte von einer 20 std. Bouillonkultur (ohne Pepton), und zwar meist mit 0,1 ccm einer Verdünnung von 1:200000 in Bouillon (ohne Pepton). Die Röhrchen kamen dann in den Brutschrank und wurden bei täglicher Ablesung mindestens 4 Tage lang bebrütet. Gleichzeitig mit der Beimpfung der Röhrchen war die Einsaatmenge (0,1 ccm 1:200000) auf eine grosse Drigalski-Platte ausgestrichen, damit nach 20 std. Bebrütung die

Keimzahl bestimmt werden konnte. Diese betrug durchschnittlich 400—600 Bakterien.

Im Laufe der Untersuchungen stellte es sich heraus, dass es am zweckmässigsten war, die nach 48 std. Bebrütung erzielten Resultate der Beurteilung zu Grunde zu legen. Die Ablesung erfolgte unter Berücksichtigung der Trübung resp. des Klarbleibens der einzelnen Röhrrchen. In den folgenden Tabellen bedeutet + = starke Trübung,  $\pm$  = schwache Trübung und — = keine Trübung. Impft man aus klaren Röhrrchen auf Agarplatten aus, so kann das Röhrrchen entweder steril sein oder noch lebende Bakterien enthalten, die zu normalen Kolonien auswachsen. Hält man klare Röhrrchen länger als 2 Tage bis zu 8 Tagen im Brutschrank, so kommt es in vielen Fällen in einigen weiteren Röhrrchen zu einer Trübung, die jedoch — wie dementsprechende Versuche zeigten — oft auf einer im Versuche erworbenen Resistenzsteigerung der Bakterien beruhen. Um diese künstliche Resistenzsteigerung auszuschliessen, empfiehlt es sich, die endgültige Ablesung nach 2 Tagen vorzunehmen.

Wir haben absichtlich keine scharfe Trennung zwischen baktericider und bakteriostatischer Wirkung gezogen, da es uns in erster Linie darauf ankam, ganz allgemein die hemmende Wirkung verschiedener Präparate auf denselben Erreger, resp. die Wirkung desselben Präparates auf verschiedene Erreger festzulegen. Wir sind uns darüber im Klaren, dass man unter Berücksichtigung der baktericiden und bakteriostatischen Wirkung zu einer weiteren Differenzierung gelangen kann, ohne dass hierdurch aber die Frage nach dem Wirkungsmechanismus der betreffenden Präparate gelöst wird.

Die Tabelle 1 zeigt den ersten Versuch, in dem die Wirkung von Sulfathiazol und Sulfaguanidin auf verschiedene Bakterien geprüft wurde.

Es geht aus der Tabelle 1 deutlich hervor, dass die Wirkung des Sulfathiazols erheblich stärker ist als diejenige des Sulfaguanidins, und dass die Empfindlichkeit der einzelnen Kulturen sehr verschieden ist; doch sind die gegen Sulfathiazol empfindlichen Kulturen ebenfalls dem Sulfaguanidin gegenüber am empfindlichsten. Am besten wurde die Kultur von *S. cholerae suis* beeinflusst, da noch eine Sulfathiazol-

Tabelle 1.  
Sulfathiazol.

Glas	Verdünnung	Kultur						
		1	2	3	4	5	6	7
1	500	—	—	—	—	—	—	—
2	1000	—	—	—	—	—	—	—
3	2000	—	—	—	—	—	—	—
4	4000	—	—	—	—	—	—	—
5	10 000	—	—	—	—	—	—	—
6	20 000	—	+	—	—	—	—	—
7	40 000	±	+	—	±	±	—	—
8	80 000	+	+	—	+	+	—	+
9	160 000	+	+	—	+	+	—	+
10	320 000	+	+	—	+	+	+	+
Kontrolle		+	+	+	+	+	+	+

Sulfaguanidin.

Glas	Verdünnung	Kultur						
		1	2	3	4	5	6	7
1	500	+	+	—	±	±	—	—
2	1000	+	+	—	+	+	—	+
3	2000	+	+	—	+	+	+	+
4	4000	+	+	—	+	+	+	+
5	10 000	+	+	+	+	+	+	+
6	20 000	+	+	+	+	+	+	+
7	40 000	+	+	+	+	+	+	+
8	80 000	+	+	+	+	+	+	+
9	160 000	+	+	+	+	+	+	+
10	320 000	+	+	+	+	+	+	+

Zeichenerklärung: 1 = *S. paratyphi A*  
 2 = *S. typhi murium*  
 3 = *S. cholerae suis*  
 4 = *S. newport*  
 6 = Dysenterie Flexner  
 7 = *Coli*

Einsaat = 0,2 ccm 1:200000. Ablesung nach 48 Stunden 37° C.  
 — = klar, ± = schwach trüb, + = trüb.

Konzentration von 1 : 320000 das Wachstum der Bakterien (48 Std. lang) verhindern konnte. Nach 3 Tagen war das letzte Glas (10) dieser Versuchsreihe getrübt, während die übrigen 9 Gläser klar waren. Die geringste Empfindlichkeit unter den hier geprüften *Salmonella*-Kulturen wies die *Salmonella typhi* murium-Kultur auf, die eine Empfindlichkeit von »5« hatte, wenn wir den Grad der Empfindlichkeit nach der Nummer des letzten klaren Glases (48 Std. 37° C.) angeben. Dieselbe Sulfathiazol-Empfindlichkeit wiesen 2 Stämme von *S. paratyphi* B auf, die in einem folgenden Versuche untersucht wurden. Ein zweiter *S. paratyphi* A-Stamm hatte ebenfalls dieselbe Sulfathiazol-Empfindlichkeit wie der in Tabelle 1 erwähnte Stamm. Dem Sulfaguanidin gegenüber waren auch diese Stämme sehr resistent, da es nach 48 std. Bebrütung in allen 10 Gläsern zur Trübung kam. Wir gaben daher die weitere Prüfung des Sulfaguanidins auf und benutzten an seiner Stelle das Sulfapyridin, das wir mit dem Sulfathiazol verglichen.

Während wir in den ersten Versuchen (Tabelle 1) eine Kultur-Einsaat von 0,2 ccm der Verdünnung 1:200000 benutzt hatten, wandten wir zu allen folgenden Versuchen nur 0,1 ccm der Verdünnung 1:200000 an, d. h. ca. 400—600 Bakterien pro Glas. Bei Kulturen, die erheblich schwächer in Bouillon wuchsen, wie z. B. *Salmonella abortus ovis* und *Salmonella typhi* suis, verwandten wir 0,1 ccm der Verdünnung 1:20000. Ferner gingen wir bei der grossen Sulfathiazol-Empfindlichkeit der Kulturen dazu über, andere Verdünnungen des Präparats als bisher zu benutzen (siehe Tabelle 2). Wenn wir also im folgenden von einer Empfindlichkeit »5« sprechen, so bedeutet dieses, dass der betreffende Stamm nach 48 std. Bebrütung nur in den Gläsern 6—10 Wachstum zeigte, dass also die Gläser 1—5 klar geblieben waren. In diesem Falle hemmte noch eine Konzentration von 1:40000 das Wachstum der eingesäten Bakterien.

Die vergleichenden Versuche mit Sulfathiazol und Sulfapyridin ergaben, dass Sulfathiazol stärker wirkte als Sulfapyridin, das also hinsichtlich seiner in vitro Wirkung zwischen Sulfathiazol und Sulfaguanidin stand. In der Tabelle 2 sind einige dieser Versuche dargestellt.

Tabelle 2.  
Sulfathiazol.

Glas	Verdünnung	Kultur						
		1	2	3	4	5	6	7
1	2500	—	—	—	—	—	—	—
2	5000	—	—	—	—	—	—	—
3	10 000	—	—	—	—	—	—	—
4	20 000	—	—	—	—	—	—	—
5	40 000	+	+	—	—	—	—	—
6	80 000	+	+	—	+	—	—	—
7	160 000	+	+	—	+	+	—	+
8	320 000	+	+	—	+	+	+	+
9	640 000	+	+	+	+	+	+	+
10	1280 000	+	+	+	+	+	+	+

Sulfapyridin.

Glas	Verdünnung	Kultur						
		1	2	3	4	5	6	7
1	2500	—	—	—	—	—	—	—
2	5000	—	—	—	—	—	—	—
3	10 000	+	+	—	—	—	—	—
4	20 000	+	+	—	+	—	—	—
5	40 000	+	+	—	+	+	—	—
6	80 000	+	+	+	+	+	—	—
7	160 000	+	+	+	+	+	+	+
8	320 000	+	+	+	+	+	+	+
9	640 000	+	+	+	+	+	+	+
10	1280 000	+	+	+	+	+	+	+

Zeichenerklärung: 1 = *S. paratyphi* A  
 2 = *S. paratyphi* B  
 3 = *S. cholerae* suis  
 4 = *S. newport*  
 5 = *S. typhi*  
 6 = Dysenterie Flexner  
 7 = *Coli*

Einsaat: 0,1 ccm 1:200000. Ablesung nach 48 Stunden 37° C. Der Stamm von *S. cholerae* suis dieser Tabelle ist nicht identisch mit dem Stamme von *S. cholerae* suis der Tabelle 1.



Das Resultat des in Tabelle 2 wiedergegebenen Versuches bedarf keiner näheren Erläuterung; die stärkere Wirkung des Sulfathiazol tritt klar zu Tage, sodass wir in den folgenden Versuchen nur mit Sulfathiazol gearbeitet haben. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3 summarisch dargestellt.

Tabelle 3.  
Sulfathiazol-Empfindlichkeit.

Kultur	Zahl der Stämme	durchschnittliche Empfindlichkeit
S. paratyphi A	2	4
S. „ B	8	4—5
S. „ C	2	6
S. cholerae suis	7	7—8
S. typhi	13	5—6
95 verschiedene Salmonella-Typen	105	5
Dysenterie Flexner	5	8
„ Sonne	1	7
„ Shiga	1	10
Coli	34	5

Zeichenerklärung: 4 = 1:20000 hemmend  
 5 = 1:40000 „  
 6 = 1:80000 „  
 7 = 1:160000 „  
 8 = 1:320000 „  
 10 = 1:1280000 „

Aus der Tabelle 3 geht hervor, dass unter den Salmonella-Kulturen die Salmonella cholerae-suis-Stämme die empfindlichsten sind, da Sulfathiazol noch in einer Verdünnung von 1:160000—1:320000 das Wachstum zu hemmen vermag. Ebenso empfindlich sind Dysenterie Flexner-Kulturen, während die meisten Salmonella-Typen, die sogenannten Enteritis-Erreger, eine durchschnittliche Empfindlichkeit von 5 haben. Es sei jedoch bemerkt, dass die in diese Gruppe eingerech-

neten Typen *S. abortus equi*, *S. abortus ovis* und *S. enteritidis* var. danysz eine höhere Empfindlichkeit von 6—8 haben. 13 Kulturen von *S. typhi* hatten die Empfindlichkeit 5—6, d. h. sie wurden noch in Verdünnungen von 1:40000—1:80000 gehemmt resp. abgetötet, und zwar unabhängig vom Vi-Antigen. Unter den Coli-Kulturen, die eine durchschnittliche Empfindlichkeit von 5 hatten, befanden sich vorwiegend Stämme, die aus Infektionen der Harnwege isoliert waren.

Nur wenige Salmonella-Kulturen wie *S. oslo*, *S. castbourne*, *S. give*, *S. uganda* und *S. muenster* waren gegen Sulfathiazol ziemlich resistent, da ihre Empfindlichkeit durchschnittlich bei 3 lag. Im grossen und ganzen muss man also sagen, dass Salmonella-Kulturen von Sulfathiazol in vitro stark beeinflusst werden, sodass auch mit der Möglichkeit eines Effektes in vivo zu rechnen war.

## II. Mäuse-Versuche.

Zu den folgenden Mäuseversuchen (weisse Mäuse zwischen 18—20 g) wurden 3 verschiedene Salmonella-Typen benutzt:

1. *S. typhi* murium, Sulfathiazol-Empfindlichkeit = 4,
2. *S. cholerae* suis var. kunzendorf, Sulfathiazol-Empfindlichkeit = 8,
3. *S. enteritidis* var. danysz, Sulfathiazol-Empfindlichkeit = 7—8.

Der erste Versuch wurde mit *S. enteritidis* var. danysz angesetzt und hatte das in Tabelle 4 wiedergegebene Resultat.

In technischer Hinsicht sei erwähnt, dass die Mäuse per os infiziert wurden. Sie erhielten eine dichte Bakterienaufschwemmung (1 Petrischale auf 15 ccm Leitungswasser) auf Brot, und zwar ca. 2 ccm der Aufschwemmung pro Maus. Die Sulfonamid-Präparate wurden in Tragakanth aufgeschwemmt den Mäusen mit Hilfe einer gläsernen Schlundsonde, die an eine Spritze montiert war, per os gegeben, und zwar pro Tag 30 mg. Die während des Versuches gestorbenen Mäuse wurden seciert, wobei ein Tropfen Herzblut auf eine Drigalskiagarplatte ausgeimpft wurde. Bei späten Todesfällen

wurden ausserdem Milz- und Leber-Stücke auf Platten ausgestrichen.

Tabelle 4.  
Mäusefütterungsversuch mit *S. enteritidis* var. *danzs.*

Zahl der Mäuse	Sulfapyridin 30 mg pro Tag	Zahl der gestorbenen Mäuse		Intercurrent gestorben
		6.—9. Tag	10.—16. Tag	
10	1.— 8. Tag	3	7	0
10	1.—16. „	3	6	1
10	4.—12. „	5	5	0
10	4.—20. „	4	6	0
10	—	10	0	0

Erläuterung: Die ersten 10 Mäuse wurden vom Infektionstage an gerechnet 8 Tage lang mit Sulfapyridin behandelt, die nächsten 10 Mäuse 16 Tage lang. Die übrigen 20 Mäuse wurden erst am 4. Tage nach der Infektion behandelt, und zwar 8 resp. 16 Tage lang. Die Kontrollen starben an folgenden Tagen: 1 am 6. Tage, 4 am 7. Tage, 4 am 8. Tage und 1 am 9. Tage.

Der in Tabelle 4 wiedergegebene Versuch ergab, dass die Behandlung mit Sulfapyridin keine der infizierten Mäuse retten konnte, dass sie aber die Lebensdauer deutlich verlängerte. So starben z. B. von den 16 Tage lang (1.—16. Tag) behandelten Mäusen 1 am 8. Tage, 2 am 9. Tage, 1 am 10. Tage, 2 am 11. Tage, 1 am 12. Tage, 1 am 14. Tage und 1 am 16. Tage. Eine Maus starb intercurrent am 2. Tage; ihr Herzblut war steril. Während die Kontrollen durchschnittlich zwischen dem 7.—8. Tage starben, gingen die behandelten Mäuse durchschnittlich zwischen dem 10.—11. Tage ein.

In einem weiter unten erwähnten Versuche der gleichen Art war die Sulfapyridin-Behandlung erfolgreicher, da die behandelten Mäuse (mit einer Ausnahme) im Laufe der 2.—4. Woche starben, die Kontrollen dagegen zwischen dem 7.—8. Tage. Es gelang also nicht, mit Hilfe von Sulfapyridin die Ratin-Infektion der weissen Maus zu heilen, doch wurde die Lebensdauer der infizierten Mäuse deutlich verlängert.

Im zweiten Mäuseversuche wurde an Stelle von *S. enteri-*

tidis var. danysz eine Kultur von *S. typhi murium* genommen, wobei die Wirkung von Sulfapyridin, Sulfaguanidin und Sulfathiazol mit einander verglichen wurden. Das Ergebnis dieses Versuches ist in der Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5.  
Mäusefütterungsversuch mit *S. typhi murium*.

Zahl der Mäuse	Behandlung 30 mg pro Tag	Zahl der gestorbenen Mäuse		Intercurrent gestorben	Zahl der Überlebenden
		8.—12. Tag	13.—22. Tag		
10	Sulfapyridin 1.—15. Tag	1	4	0	5
10	Sulfaguanidin 1.—15. Tag	5	4	0	1
10	Sulfathiazol 1.—5. Tag	2	3	2	3
10	—	5	3	0	2

Erläuterung: Die Sulfathiazol-Behandlung wurde am 5. Tage abgebrochen, weil 2 Mäuse am 5. und 6. Tage starben; ihr Herzblut war steril. Diese Wirkung des Sulfathiazol ist uns aus früheren Versuchen (siehe bei K. Schmith) bekannt und durch massive Ausfällung in den Urinwegen bedingt. Ausser den in Tabelle 5 aufgeführten Mäusen behandelten wir 4 Mäuse mit 30 mg Sulfathiazol pro Tag 5 Tage lang. Von diesen 4 Mäusen starben 2 Mäuse am 5. und 6. Tage, während 4 andere Mäuse, die Sulfaguanidin erhielten, gesund blieben. Sulfapyridin wird auf Grund früherer Erfahrungen in der hier benutzten Dosis von Mäusen gut vertragen.

Aus der Tabelle 5 geht hervor, dass die beste Wirkung das Sulfapyridin hatte, da 5 von 10 Mäusen überlebten; doch bleibt zu beachten, dass auch 2 der Kontrollmäuse leben blieben. Das Sulfaguanidin erwies sich als wirkungslos; das Sulfathiazol ist wegen seiner schädigenden Wirkung nicht sicher zu beurteilen.

Der dritte Mäuseversuch wurde mit einer Kultur von *S. cholerae suis* var. kunzendorf angesetzt und ist in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6.

Mäusefütterungsversuch mit *S. cholerae suis* var. *kunzendorf*.

Zahl der Mäuse	Behandlung 30 mg pro Tag	Zahl der gestorbenen Mäuse			Intercurrent gestorben	Zahl der Überlebenden
		7.—10. Tag	11.—14. Tag	15.—30. Tag		
20	Sulfapyridin 1.—17. Tag	0	1	2	4	13
20	Sulfaguanidin 1.—17. Tag	3	3	3	2	9
10	—	4	5	0	0	1

Erläuterung: Der Versuch wurde leider durch einige intercurrente Todesfälle gestört; so starben von den Sulfapyridin-Mäusen 3 Mäuse an Ratin-Infektion und 1 Maus an einer Kokken-Infektion. Von den Sulfaguanidin-Mäusen starb 1 Maus an Ratin-Infektion, die andere an einer Coli-Infektion. Die beiden späten Todesfälle (15.—30. Tag) bei den Sulfapyridin-Mäusen erfolgten am 28. resp. am 30. Tage.

Die Tabelle 6 zeigt, dass die Sulfapyridin-Behandlung der Sulfaguanidin-Behandlung überlegen war; doch ergaben beide Behandlungen einen deutlichen Effekt. Wenn wir die intercurrenten Todesfälle ausser Betracht lassen, so überlebten von 16 mit Sulfapyridin behandelten Mäusen 13 Mäuse die Fütterungsinfektion mit Kunzendorf-Bakterien, während von 10 Kontrollmäusen nur 1 Maus überlebte. Bei der Sulfaguanidin-Behandlung überlebten von 18 Mäusen (intercurrente Todesfälle abgerechnet) 9 Mäuse. Ausserdem kommt bei den behandelten Mäusen, die starben, eine deutliche Verlängerung der Lebenszeit zum Ausdruck.

Die Kunzendorf-Infektion der Maus ist also durch Präparate der Sulfonamid-Gruppe besser zu beeinflussen als die Infektion mit *S. typhi murium* oder *S. enteritidis* var. *danzysz*, die am schlechtesten zu hemmen ist.

Im vierten Mäuseversuche, zu dem eine Kultur von *S. typhi murium* benutzt wurde, sollte geprüft werden, ob die Kombination von Sulfapyridin und Vaccination die per os

infizierten Mäuse retten konnte. Wie es aus der Tabelle 5 und aus anderen, früheren Erfahrungen hervorgeht, vermag die alleinige Vaccination resp. die Sulfapyridin-Behandlung höchstens die Hälfte der infizierten Mäuse zu retten. Auf Grund der Erfahrungen mit Pneumokokken (siehe bei K. Schmith) war es jedoch wahrscheinlich, dass eine kombinierte Behandlung eine bessere Wirkung haben würde. Dass dieses tatsächlich der Fall war, geht aus der Tabelle 7 hervor.

Tabelle 7.  
Mäusefütterungsversuch mit *S. typhi murium*.

Zahl der Mäuse	Vaccination	Sulfapyridin 30 mg pro Tag	Zahl der gestorbenen Mäuse				Intercurrent gestorben	Zahl der überlebenden
			8. - 12. Tag	13. 22. Tag	23. 32. Tag			
20	+	1. - 17. Tag	1	2	2		1	14
20	+	—	10	6	0		1	3
20	—	1. - 17. Tag	8	7	1		6	4
20	—	—	12	3	1		3	1

Erläuterung: Die Vaccination der ersten 40 Mäuse (in der Tabelle mit + bezeichnet) erfolgte subcutan am 7.11.31 und 11.11.31 mit einer 100° Vaccine (1 Std. erhitzt) von *S. typhi murium*, und zwar mit je resp. 100 Millionen Bakterien. Am 18.11.31 erfolgte dann die per os Infektion mit *S. typhi murium*. Mit Sulfapyridin wurden nur diejenigen Mäuse behandelt, bei denen in der Tabelle 1. - 17. Tag steht. Der erste intercurrente Todesfall beruhte auf einer Ratin-Infektion, der zweite auf einer Coli-Infektion, während die 3 intercurrenten Todesfälle der Kontrollen auf Ratin-Infektion beruhten. Die überlebenden Mäuse wurden am 12. Versuchstage — ebenso wie in allen vorhergehenden Versuchen — getötet, worauf Herzblut, Milz und Leber bakteriologisch untersucht wurden. Ein Teil dieser Mäuse erwies sich als steril, ein Teil enthielt in Leber oder Milz resp. in beiden Organen *S. typhi murium*.

Es geht aus der Tabelle 7 hervor, dass der beste Effekt bei denjenigen Mäusen erzielt wurde, die sowohl vacciniert

als auch chemotherapeutisch behandelt waren, wobei zu berücksichtigen ist, dass die vorgenommene Vaccination absichtlich schwach war, um den Kombinations-Effekt besser hervortreten zu lassen. Es kommt hinzu, dass der durchschnittliche Todestag der 5 Mäuse, die vacciniert und chemotherapeutisch behandelt waren, der 23. Tag war, während der durchschnittliche Todestag der Kontrollen auf den 12. Tag fiel.

In der Wirkung des Sulfapyridins auf die Mäuseinfektion mit *S. cholerae suis* var. *kunzendorf*, *S. typhi* murium und *S. enteritidis* var. *danzs* bestehen deutliche Unterschiede, die sich nach der Art des Erregers richten. So nimmt die Wirkung auf diese 3 Erreger in der obigen Reihenfolge ab, da Ratin-Bakterien am schlechtesten beeinflusst werden. Die Empfindlichkeit der Ratin- und Kunzendorf-Bakterien gegen Sulfapyridin ist gleich hoch, ebenso die Mäusevirulenz beider Typen, sodass also die verschiedene Wirksamkeit von Sulfapyridin nicht auf diese Faktoren zurückgeführt werden kann. Wenn man von der Annahme ausgeht, dass Präparate der Sulfonamid-Gruppe erst dann zur vollen Wirkung gelangen, wenn ihre bakterienhemmende Wirkung durch die Immstoffe des Organismus ergänzt wird, so muss man schliessen, dass Mäuse schlechtere Immstoff-Bildner gegen Ratin- als gegen Kunzendorf-Bakterien sind. Dieses scheint nun tatsächlich der Fall zu sein, wie folgender Versuch zeigt.

Je 20 Mäuse wurden mit Ratin- resp. Kunzendorf-Bakterien (100° Vaccine) aktiv immunisiert. Die Mäuse erhielten i. p. dreimal in Abständen von je 4 Tagen 20, 40 resp. 100 Millionen Bakterien und wurden 3 Tage nach der letzten Vaccination mit Ratin- resp. mit Kunzendorf-Bakterien infiziert. Das Ergebnis dieses Versuches ist in der Tabelle 8 dargestellt.

In einem Parallel-Versuche wurde das Serum von je 6 Mäusen, die in derselben Weise mit Ratin- resp. mit Kunzendorf-Bakterien vacciniert waren, auf O-Agglutinine hin geprüft. Während das Serum der mit Kunzendorf-Bakterien immunisierten Mäuse die homologe Kultur bis 1 : 80 körnig agglutinierte, gab das Serum der mit Ratin-Bakterien immunisierten Mäuse ab 1 : 20 keine Spur von Agglutination.

Tabelle 8.

Mäusefütterungsversuch nach Vaccination.

a) *S. enteritidis* var. *danyisz*.

Zahl der Mäuse	Vaccination	Zahl der gestorbenen Mäuse		Intercurrent gestorben	Zahl der Überlebenden
		5.—6. Tag	7.—8. Tag		
20	+	5	14	1	0
20	—	7	13	0	0

b) *S. cholerae suis* var. *kunzendorf*.

Zahl der Mäuse	Vaccination	Zahl der gestorbenen Mäuse			Intercurrent gestorben	Zahl der Überlebenden
		5.—8. Tag	9.—12. Tag	13.—32. Tag		
20	+	0	7	7	0	6
20	—	15	4	0	1	0

Erläuterung: Vaccination+ = Mäuse wurden vacciniert.

» — = » » nicht vacciniert.

Der in Tabelle 8 wiedergegebene Versuch zeigt, dass es nicht gelungen war, Mäuse aktiv gegen eine Ratin-Infektion zu immunisieren, da es nicht einmal zu einer Verlängerung der Lebensdauer kam. Im Gegensatz hierzu hatte die Immunisierung mit Kunzendorf-Bakterien einen deutlichen Effekt, da 6 Mäuse überlebten und die übrigen erheblich später starben als die Kontrollen. Der durchschnittliche Todeslag der vaccinierten Mäuse war der 16. Tag, derjenige der Kontrollen der 7. Tag. Da man also Mäuse gegen eine tödliche Ratin-Infektion nicht aktiv immunisieren kann, so wird man wahrscheinlich auch mit einer kombinierten Behandlung (Vaccination + Chemotherapie) keine besseren Erfolge erzielen können. Es blieb daher zu prüfen, ob durch passive Immunisierung + Chemotherapie die Ratin-Infektion der Maus zu beeinflussen war. Wir behandelten daher 20 mit Ratin infizierte Mäuse sowohl mit Sulfapyridin als auch mit O-Immunserum von *S. typhi* (Titer 1 : 6400). Die Tiere erhielten



am Tage vor der per os-Infektion sowie am 1. und 4. Tage nach der Infektion je 0,2 ccm des Immunsrum i. p. Zur Kontrolle dienten 20 Mäuse, die nur mit Serum behandelt wurden, 20 Mäuse, die nur mit Sulfapyridin behandelt waren und 20 Mäuse, die überhaupt nicht behandelt wurden. Alle 80 Mäuse erhielten dieselbe Ratin-Infektion per os.

Die unbehandelten Kontrollen starben zwischen dem 7.—8. Tage, ebenso die Mäuse, welche nur mit O-Immunsrum behandelt waren, sodass also die Serumbehandlung ohne jeden Effekt war. Am besten schnitten die Mäuse ab, welche nur Sulfapyridin erhielten, da von diesen im Laufe der 2.—4. Woche 19 Mäuse starben, während 1 Maus noch nach 4 Wochen lebte. Die 20 mit Serum + Sulfapyridin behandelten Mäuse starben zwar später als die Kontrollen, aber früher als die Sulfapyridin-Mäuse (im Laufe der 2.—3. Woche), sodass es also nicht gelang, die Sulfapyridinbehandlung der Ratin-Infektion durch Injektion eines Typhus O-Serum zu verbessern. Man muss aus diesem Versuche schliessen, dass die Serumgabe, also die Anwesenheit von O-Antikörpern, die Wirkung des Sulfapyridins nicht steigerte. Man kann aber auch folgern, dass die Behandlung mit einem Typhus O-Serum keine adaequate Serumtherapie der Ratin-Infektion darstellt, obwohl Typhus- und Ratin-Bakterien dasselbe IX-Antigen besitzen. Es ist denkbar, dass ein mit lebenden Ratin-Bakterien hergestelltes Immunsrum einen besseren Effekt als das Typhus O-Serum gehabt hätte; doch stand uns ein solches Ratin-Serum nicht zur Verfügung. Wir dürfen nicht vergessen, dass die O-Formeln des diagnostischen Antigen-schema nach *Kauffmann-White* nichts über die immunisierenden Eigenschaften dieser Antigene bei Infektionen mit den betreffenden Erregern aussagen, da diese Beziehungen bisher noch nicht näher untersucht wurden.

### *Besprechung der Ergebnisse.*

Im Reagenzglase wirken Präparate der Sulfonamid-Gruppe wie Sulfapyridin, Sulfaguanidin und Sulfathiazol auf Bak-

terien der Salmonella-, Dysenterie- oder Coli-Gruppe wachstumshemmend oder abtötend. Die stärkste Wirkung kommt dem Sulfathiazol zu, während das Sulfaguanidin die schwächste Wirkung hat. Es empfiehlt sich, die Versuche in peptonfreier Bouillon auszuführen, da Pepton die Wirkung der Chemotherapeutica mehr oder weniger hemmt. Da die Kulturen in Bouillon mit Sulfonamid-Präparaten bei längerem Aufenthalt eine gesteigerte Resistenz erwerben, sollen Versuche, welche die primäre Empfindlichkeit der zu prüfenden Kulturen zeigen sollen, nach 48 std. Bebrütung bei 37° C. abgelesen werden. Derartige Versuche ergeben eine verschiedene Resistenz der einzelnen Salmonella-Typen, während Kulturen desselben Typus im allgemeinen gleich empfindlich sind; doch kommen auch innerhalb desselben Typus Kulturen von verschiedener Empfindlichkeit vor. Am empfindlichsten erwies sich der *S. cholerae suis*-Typus, und zwar gleichgültig, ob es sich um den diphasischen oder den monophasischen Typus (Kunzendorf) handelte. So vermochte das Sulfathiazol noch in Verdünnungen von 1 : 160000—1 : 320000 das Wachstum der *S. cholerae suis*-Bakterien zu hemmen. Die Mehrzahl der übrigen Salmonella-Typen wurde durch eine Verdünnung von 1 : 40000 deutlich im Wachstum gehemmt.

Verschiedene aus Infektionen der Harnwege isolierte Coli-Stämme wurden durchschnittlich von denselben Verdünnungen (1 : 40000) gehemmt, während Dysenterie-Kulturen erheblich empfindlicher waren und sich hierin wie *S. cholerae suis*-Kulturen verhielten.

Auf Grund dieser starken in vitro-Wirkung von Sulfonamid-Präparaten konnte man auch mit einer Wirkung in vivo rechnen, wobei jedoch mit der verschiedenen Toxizität, Resorption und Ausscheidung der betreffenden Präparate zu rechnen ist. Wie es aus früheren Versuchen mit Pneumokokken bekannt war, ist das Sulfathiazol für Mäuse schädlich, trotzdem es schnell aus dem Organismus ausgeschaltet wird. Es ist deshalb schwierig, Mäuseversuche derartig anzusetzen, dass die Überlegenheit des Sulfathiazol, die sich in vitro und auch im Menschen äussert, zu Tage tritt. Wir haben deshalb

hauptsächlich mit Sulfapyridin gearbeitet, das von den Mäusen gut vertragen und langsam ausgeschieden wird. Sulfaguanidin, das im Reagenzglase schwach wirkte, stand auch im Mäuseversuche hinter Sulfapyridin zurück. Wie die obigen Versuchsprotokolle zeigen, verhalten sich die einzelnen Salmonella-Infektionen im chemotherapeutischen Versuch sehr verschieden. So zeigte das Sulfapyridin gegenüber einer Fütterungsinfektion mit Ratin-Bakterien eine schwache Wirkung, da hierbei nur die Lebensdauer der infizierten Mäuse verlängert wurde. Bei der Fütterungsinfektion mit *S. typhi murium* kam eine stärkere Wirkung zum Vorschein, die bei der Kunzendorf-Infektion noch ausgesprochener war. Hier überlebte die Mehrzahl der behandelten Mäuse die schwere Infektion, während die übrigen stark verzögert starben. Das Sulfaguanidin hatte unter den gleichen Bedingungen eine sehr viel schwächere Wirkung.

Von der Annahme ausgehend, dass es nur dann zu einer optimalen Wirkung von Sulfonamid-Präparaten in der Maus kommt, wenn das Tier gleichzeitig eine gute Antikörperproduktion aufweist, wurde eine Serie von Mäusen mit *S. typhi murium* vacciniert und dann nach erfolgter per os-Infektion mit Sulfapyridin per os behandelt. In diesem Versuche überlebten von 19 Mäusen 14 die schwere Infektion (von 17 Kontrollen überlebte nur 1 Maus), die übrigen 5 vaccinierten Mäuse starben stark verzögert. Die Vaccination allein rettete von 19 Mäusen nur 3, während die alleinige Sulfapyridin-Behandlung von 20 Mäusen nur 4 zu retten imstande war. Es geht aus diesem Versuche klar hervor, dass eine vorhergehende Vaccination die Wirkung von Sulfapyridin erheblich zu steigern vermag.

Die schlechte Wirkung des Sulfapyridins bei der Ratin-Infektion beruht wahrscheinlich auf der schlechten oder fehlenden Antikörperbildung im Verlaufe dieser Infektion, da es in einem Versuche nicht gelang, Mäuse gegen eine tödliche Ratin-Infektion aktiv zu immunisieren. Unter den gleichen Bedingungen hatte eine Vaccination gegen Kunzendorf-Bakterien eine deutliche Wirkung. Während im Serum der mit

Kunzendorf vaccinierten Mäuse O-Agglutinine nachweisbar waren, fehlten diese Antikörper im Serum der mit Ratin vaccinierten Tiere. Das Fehlen dieser O-Antikörper zeigt wahrscheinlich das Fehlen anderer Abwehrkräfte an, da wir nicht annehmen, dass die O-Agglutinine die einzigen Antikörper sind, die bei der Infektionsabwehr eine Rolle spielen.

Auf Grund dieser tierexperimentellen Erfahrungen wird man wohl auch mit einer Wirkung von Sulfonamid-Präparaten bei menschlichen Infektionen mit Salmonella-, Dysenterie- oder Coli-Bakterien rechnen dürfen, zumal günstige Erfahrungen bei Coli-Infektionen bereits in grösserer Zahl vorliegen. Vor allem erscheint es als aussichtsreich, menschliche Infektionen mit *S. cholerae suis*, die oft einen septischen Charakter haben, chemotherapeutisch zu behandeln, zumal dieser Salmonella-Typus gegen Präparate der Sulfonamid-Gruppe hoch empfindlich und auch im Mäuseversuche am besten beeinflussbar ist. Wir glauben, dass richtig angesetzte und vorsichtig gedeutete Reagenzglas- und Tierversuche in den meisten Fällen einen Rückschluss auf die Wirkung chemotherapeutischer Präparate im Menschen zulassen.

### *Zusammenfassung.*

- 1) Es werden chemotherapeutische Versuche mit Präparaten der Sulfonamid-Gruppe (Sulfapyridin, Sulfaguanidin und Sulfathiazol) mitgeteilt, die eine gute Wirkung auf Bakterien der Salmonella-, Dysenterie- und Coli-Gruppe ergaben. Im Reagenzglas hatte die beste Wirkung das Sulfathiazol, die schwächste das Sulfaguanidin.
- 2) Im Mäusefütterungsversuche mit *Salmonella typhi murium* wurden die besten Resultate erzielt, wenn man die Mäuse vor der Infektion vaccinierte und dann nach erfolgter Infektion mit Sulfapyridin behandelte. Auf diese Weise gelang es, im Gegensatz zu allen früheren Erfahrungen auf diesem Gebiete, den grössten Teil der infizierten Tiere zu retten.

- 3) Die besten chemotherapeutischen Erfolge (ohne Vaccination) wurden bei der Kunzendorf-Infektion der Maus erzielt, die schlechtesten bei der Ratin-Infektion, obwohl beide Erreger (*S. cholerae suis* var. kunzendorf und *S. enteritidis* var. danysz) gegen Sulfonamid-Präparate hoch empfindlich und für Mäuse gleich virulent sind. Der Grund für diese schlechte Beeinflussbarkeit der Ratin-Infektion wird in der mangelhaften Antikörper-Bildung der Maus gegen Ratin-Bakterien erblickt. Es wird also angenommen, dass es erst dann zu einem chemotherapeutischen Effekt von Sulfonamid-Präparaten kommt, wenn die unzweifelhafte, direkte antibakterielle Wirkung der betreffenden Präparate durch die eigene Antikörper-Bildung des Organismus unterstützt wird.

## LITERATUR.

- Bliss, E. A. und P. H. Long: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* 39, 483, 1938.  
 Bornstein, S. und L. Strauss: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* 47, 112, 1941.  
 Frisk, A. R.: *Act. Med. Scand.* 109, 355, 1941.  
 Hjorth, P. und F. Wulff: *Nord. Med.* 12, 3715, 1941.  
 Ivánovics, G.: *Z. Immunf.* 101, 58, 1942.  
 Kauffmann, F.: »Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe«. Einar Munksgaard, Kopenhagen 1941.  
 Levi, J. E. und A. Willen: *J. Amer. Med. Assoc.* 116, 2258, 1941.  
 Libby, R. L. und A. L. Joyner: *J. Inf. Dis.* 67, 67, 1940.  
 Marshall, E. K. jr., A. C. Bratton, L. B. Edwards und E. Walker: *Bull. Johns Hopk. Hosp.* 68, 94, 1941.  
 Marshall, E. K. jr., A. C. Bratton, H. J. White und J. T. Litchfield: *Bull. Johns Hopk. Hosp.* 67, 163, 1940.  
 Melton, G. und A. Beck: *Lancet* 1939, I, 867.  
 Schmith, K.: »Experimental Studies on the Effect of Sulfapyridine on Pneumococci and Gonococci«. Nyt Nordisk Forlag, Arnold Busck. Kopenhagen 1941.  
 — *Nord. Med.* 8, 2211, 1940.  
 Schmith, K. und F. Reymann: *Nord. Med.* 8, 2500, 1940.

## ÜBER NEUE THERMOLABILE KÖRPER- ANTIGENE DER COLI-BAKTERIEN.\*)

Von F. Kauffmann.

(Eingegangen bei der Redaktion am 27. Februar 1942).

Im Laufe systematischer Arbeiten über die Serologie der Coli-Bakterien fand ich eine Reihe neuer, thermolabiler Körperantigene, über die im folgenden berichtet wird. Da diese Antigene in verschiedener Hinsicht erheblich labiler als die bisher bekannten Antigene sind, so habe ich sie »*L-Antigene*« (von dem Worte »*labil*« abgeleitet) genannt.

### I. Serologische Versuche.

#### 1. Der Nachweis des *L-Antigens*.

Agglutinierte man verschiedene *lebende* Coli-Kulturen, besonders solche, die aus Urin bei Infektionen der Harnwege oder aus Eiter, Galle und Blut isoliert waren, in den entsprechenden O-Seren (mit 100<sup>0</sup>-Kulturen hergestellt), so waren in vielen Fällen sowohl die Objektglas- als auch die Reagenzglas-Agglutination völlig negativ oder nur sehr schwach positiv. Zur Objektglas-Agglutination wurde eine Serumverdünnung von 1 : 10 benutzt. Die Reagenzglas-Agglutination wurde in Serumverdünnungen ab 1 : 20 angesetzt und nach 2 Std. 37° C. sowie weiteren 20 Std. Zimmertemperatur mit der Lupe (8fach) abgelesen. Zur Agglutination wurden in beiden Fällen lebende Agarkulturen (20 Std. 37° C.) ange-

---

\*) Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden am 10. 4. 42 in der Dänischen Pathologen-Vereinigung Kopenhagen vorgetragen.

wandt. Gebrauchte man dagegen zur Reagenzglas-Agglutination gekochte Coli-Kulturen, so erhielt man in den entsprechenden O-Seren sehr starke, typische O-Agglutinationen bis zum O-Titer der Seren, der meist bei 1 : 5000 lag.

Es handelte sich hier also um eine Erscheinung, die von der Typhus-Serologie her bekannt ist, nämlich um eine ausgesprochene »O-Inagglutinabilität«.

Immunisierte man mit solchen lebenden, O-inagglutinablen Coli-Kulturen Kaninchen, so erhielt man Seren, die sowohl die lebenden als auch die gekochten Bakterien des betreffenden Stammes agglutinierten; doch lagen die O-Titer höher als die L-Titer. Diese Seren besaßen nämlich 2 verschiedene Körper-Agglutinine: O- und L-Agglutinine. Absorbierte man ein mit lebenden Coli-Bakterien hergestelltes Serum (OL-Serum) mit gekochten Bakterien, so entfernte man hierdurch nur die O-Agglutinine, während die L-Agglutinine im Serum zurückblieben. Dieser Versuch beweist, dass die L-Antigene vom Vi-Antigen, das A. *Felix* und R. M. Pitt fanden, verschieden sind, da bekanntlich auch gekochte Typhus-Bakterien der V-Form das Vi-Agglutinin binden.

Die zur Immunisierung benutzten Coli-Kulturen waren ganz oder fast unbeweglich und lieferten, bei Anwendung von lebenden Bakterien oder Formalin-Bouillonkulturen, keine H-Agglutinine.\*)

In der Tabelle 1 sind die Versuche, aus denen die Anwesenheit des L-Antigens hervorgeht, dargestellt.

Aus der Tabelle 1 geht hervor, dass die lebenden Bakterien des Stammes U 14 nicht vom O-Serum, sondern nur vom OL-Serum agglutiniert werden. Ferner zeigt die Tabelle, dass ein O-Serum sowohl von lebenden als auch von 100°-Bakterien absorbiert werden kann. Dagegen wird das OL-Serum nur von lebenden Bakterien völlig erschöpft, nicht dagegen von 100°-Bakterien, da hier noch die L-Agglutinine im Serum zurückbleiben. Die bindende Eigenschaft des L-Antigens wird also durch Erhitzung auf 100° C. (1—2 Std. lang) zerstört, sodass die Vermutung, dass hier ein Vi-Antigen als Ursache der O-

---

\*) Zur Prüfung auf Beweglichkeit müssen junge Bouillonkulturen (5 Std. 37° C.) angewandt werden.

Tabelle 1.

Ergebnisse der Reagenzglas-Agglutination mit Immunsereen des Coli-Stammes U 14.

Kultur U 14	O-Immunsereum									
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
lebend	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
100°	++	++	++	++	++	++	++	++	+	—
OL-Immunsereum										
lebend	++	++	++	++	++	++	++	—	—	—
100°	++	++	++	++	++	++	++	++	+	—
O-Immunsereum absorbiert mit lebenden oder 100°-Bakterien										
lebend	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
100°	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
OL-Immunsereum absorbiert mit 100°-Bakterien										
lebend	++	++	++	++	++	++	+	—	—	—
100°	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
OL-Immunsereum absorbiert mit lebenden Bakterien										
lebend	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
100°	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Zeichenerklärung: Die Zahlen 20, 40.... geben die Serumverdünnungen an. — = negative Agglutination, + oder ++ = positive Agglutination.

Die Agglutination mit lebenden Bakterien wurde nach 2 Std. 37° C. und 20 Std. Zimmertemperatur, diejenige mit 100°-Bakterien nach 20 Std. Wasserbad 50° C. abgelesen (Lupe 8fach).

Lebende Kultur = Aufschwemmung einer 20 std. Agarkultur in NaCl-Lösung. 100°-Kultur = 20 std. Bouillonkultur 2½ Std. auf 100° C. im Dampftopfe erhitzt. O-Immunsereum = mit 100°-Bakterien hergestellt; OL-Immunsereum = mit lebenden Bakterien hergestellt.

Inagglutinabilität vorlag, fallen gelassen werden musste. Es sei jedoch daran erinnert, dass ich früher bei mehreren Stämmen von Salmonella coli 1 das Vi-Antigen nachgewiesen habe.

Die L-Antigene unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Resistenz vom Vi-Antigen, sondern auch serologisch, da



ein Vi-Serum die O-inagglutinablen Coli-Stämme nicht agglutinierte.

Auch von dem früher von mir nachgewiesenen  $V_2$ -Antigen, das ebenfalls ein besonderes, thermolabiles Körperantigen der Salmonella-Kulturen mit V-Antigen (Fünf-Antigen) ist, unterscheiden sich die L-Antigene der Coli-Bakterien. Dieses geht aus der Tabelle 2 hervor, in der Resistenzunterschiede dieser 3 thermolabilen Körperantigene dargestellt sind (betreffs weiterer Eigenschaften des Vi-Antigens siehe bei A. Felix und Mitarbeitern).

Bei dieser Gelegenheit habe ich meine früheren Versuche über die Sonderstellung des  $V_2$ -Antigens wiederholt und bestätigt. Ich benutzte hierzu eine kürzlich erhaltene O-Form von *S. paratyphi* B, die mir vom Hygienischen Institut Basel übersandt war. Diese Kultur lag in 2 serologischen Formen vor: 1) in rein spezifischer Phase (IV.V.XII. . .b) und 2) in reiner O-Form (IV.V.XII. . .). Mit dieser lebenden O-Form immunisierte ich 3 Kaninchen und erhielt (nach Mischung der 3 fertigen Seren) ein Immunserum, das völlig frei von H-Agglutininen war. Absorbierte man dieses IV.V.XII. . .-Serum mit gekochten Bakterien des homologen Stammes, so blieben im Serum die  $V_2$ -Agglutinine zurück. Dieses  $V_2$ -Serum hatte keinerlei Wirkung auf die L-Antigene der Coli-Bakterien.

Es sei nebenbei bemerkt, dass die Kultur *Salmonella coli* 3, welche die IV.V.XII. . .-Antigene besitzt, auch das  $V_2$ -Antigen enthält.

Wir müssen demnach bei Coli-Bakterien zwischen 3 verschiedenen thermolabilen Körperantigenen unterscheiden, dem Vi-Antigen, dem  $V_2$ -Antigen und den L-Antigenen.

Aus der Tabelle 2 geht hervor, dass die L-Antigene labiler sind als alle anderen bekannten Antigene. Im Gegensatz zum Vi-Antigen wird die bindende Eigenschaft des L-Antigens durch Erhitzung auf 100° C. beseitigt. Da man bei der Absorption mit sehr dichten Bakterienaufschwemmungen arbeitet, so empfiehlt es sich, zur Ausschaltung des L-Antigens eine 1—2 std. Erhitzung auf 100° C. vorzunehmen und die gekochten Bakterien mit NaCl-Lösung zu waschen. Durch Er-

Tabelle 2.  
Antigen — Unterschiede.

		L	Vi	V <sub>2</sub>	V <sub>1</sub> '	IV	H	M
Lebend oder 0,5% Formalin	1	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+
1 Std. 60° C.	1	—	—	+	+	+	+	+
	2	(—)	+	+	+	+	+	+
	3	—	—	+	+	+	+	+
2½ Std. 100° C.	1	—	—	—	+	+	—	—
	2	—	+	—	+	+	—	+
	3	—	—	—	+	+	—	—
50% Alcohol 20 Std. 37° C.	1	—	—	+	+	+	—	—
	2	(—)	+	+	+	+	(—)	.
	3	+	+	+	+	+	+	—
n HCl 20 Std. 37° C.	1	—	—	—	—	+	—	—
	2	—	—	—	—	+	—	—
	3	—	—	—	—	+	—	—

Zeichenerklärung: L, Vi, V<sub>2</sub>, V<sub>1</sub> und IV = Körperantigene.

H = Geisselantigene. M = Schleimantigene.

1 = agglutinable Eigenschaft,

2 = agglutininbindende Eigenschaft,

3 = agglutinogene Eigenschaft.

+ = bleibt erhalten,

— = wird zerstört,

(—) = wird in dichter Suspension nicht völlig zerstört.

. = nicht untersucht.

hitzung auf 60° C. oder durch Alcohol-Behandlung wird die bindende Eigenschaft des L-Antigens in dichten Suspensionen nicht immer völlig zerstört.

Die mit Erhitzung, Alcohol oder Phenol behandelten O-inagglutinablen Kulturen werden O-agglutinabel; doch liefern mit Alcohol behandelte Kulturen L-Agglutinine. Die O-In-agglutinabilität lässt sich sowohl bei lebenden Kulturen mit

L-Antigen als auch bei solchen, die mit 0,5 % Formalin behandelt sind, nachweisen, sodass diese Kulturen zum Nachweise von O-Agglutininen unbrauchbar sind. Will man z. B. feststellen, ob Coli-Stämme von Salmonella O-Seren agglutiniert werden, so darf man hierzu nicht die Objektglas-Agglutination oder die Reagenzglas-Agglutination mit lebenden Bakterien anwenden, sondern muss mit gekochten Kulturen arbeiten. Der Nachweis von Salmonella H-Antigenen in Coli-Kulturen gelingt deswegen so selten, weil zahlreiche Coli-Kulturen ihr H-Antigen sehr schlecht entwickelt haben.

Es sei besonders hervorgehoben, dass die L-Antigene in verschiedener Hinsicht labiler sind als die H-Antigene. So behalten z. B. die H-Antigene, trotz Erhitzung auf 60° C., ihre agglutinogenen Eigenschaften, während die L-Antigene sie hierbei verlieren.

Zur Herstellung von OL-Immunseren wurden in erster Linie lebende Kulturen benutzt, die O-inagglutinabel waren. Doch eignen sich zur Erzielung hoher L-Titer nicht alle Stämme gleichmässig; so lieferte ein Stamm (U 14) regelmässig hohe L-Titer (durchschnittlich 1 : 1000), während andere Kulturen (z. B. U 5) niedrige L-Titer (1 : 80—1 : 160) hervorbrachten. Um festzustellen, dass auch die einzelnen Kaninchen verschieden reagieren, immunisierte ich 12 Kaninchen i. v. mit lebenden Bakterien des U 14-Stammes, wobei 1 Kaninchen starb. Die fertigen Seren der übrigen 11 Kaninchen hatten folgende L-Titer: 2 Seren = 1 : 320, 5 Seren = 1 : 640, 3 Seren = 1 : 1280 und 1 Serum = 1 : 2560. Die O-Titer dieser Seren lagen zwischen 1 : 5000—1 : 10000; H-Agglutinine konnten nicht nachgewiesen werden.

Die L-Agglutinine besitzen dieselbe Thermolabilität wie die O- und Vi-Agglutinine, unterscheiden sich also von den H-Agglutininen. Durch 1 std. Erhitzung auf 60° C. bleiben die L-Agglutinine erhalten, werden aber durch 1 std. Erhitzung auf 70° C. zerstört.

Wenn man die O-Inagglutinabilität von lebenden Kulturen erhalten will, so muss man die Agglutination nach 2 Stun-

den 37° C. und weiteren 20 Std. Zimmertemperatur ablesen. Man darf hierzu also nicht ein Wasserbad von 50° C. anwenden, da hierdurch die O-Inagglutinabilität ganz oder teilweise aufgehoben wird. Ebenso muss man zum Nachweise von L-Agglutininen das Wasserbad von 50° C. vermeiden, da es hierin nur zu einer sehr schwachen L-Agglutination kommt. Hat man es mit absorbierten Seren, in denen lebende Bakterien wachsen können, zu tun, so setzt man vor der Agglutination den Seren 0,2 % Formalin hinzu, um ein ev. krümeliges Wachstum zu verhindern. Man kann die Agglutination der absorbierten Seren mit lebenden Bakterien auch ohne ein Desinficiens ansetzen, muss die Röhrchen aber dann nach 2 Std. 37° C. in den Eisschrank (+ 4—5° C.) stellen und am nächsten Tage ablesen. In allen Fällen, in denen man mit Hilfe gekochter Bakterien O-Agglutinine nachweisen will, empfiehlt es sich, die Agglutination nach 20 Std. Wasserbad 50° C. abzulesen.

Alle in dieser Arbeit benutzten Kaninchen-Immunseren waren zur Konservierung mit 0,1‰ Merthiolat versetzt.

## 2. Vorschläge zur erstmaligen Herstellung von L-Antikörpern.

Will man sich erstmalig OL-Immunseren herstellen, so geht man zweckmässig folgendermassen vor:

Man isoliert von 10 verschiedenen Patienten mit Coli-Infektionen der Harnwege aus steril entnommenem Urin die betreffenden Coli-Stämme und stellt mit 20 std. Bouillonkulturen, die 2½ Std. auf 100° C. erhitzt sind, O-Immunseren her, indem man die Kaninchen in Abständen von je 4 Tagen mit 0,25 — 0,5 — 1,0 — 1,5 und 2,0 cc. Kultur i. v. spritzt. Dann agglutiniert man die einzelnen Coli-Stämme in ihren eigenen O-Immunseren, und zwar sowohl mit lebender Agarkultur als auch mit gekochter Bouillonkultur. Die Agglutination mit lebenden Bakterien wird nach 2 Std. 37° C. und 20 Std. Zimmertemperatur abgelesen, diejenige mit gekochten

Bakterien nach 20 Std. 50° C. Wasserbad. Alle diejenigen Stämme, die in lebendem Zustande keine Agglutination (ab 1 : 20) ergeben, sind O-inagglutinabel, falls sie in gekochtem Zustande vom O-Serum stark agglutiniert werden.

Mit den O-inagglutinablen Kulturen stellt man nun OL-Immunseren her, d. h. man immunisiert die Kaninchen mit lebenden Kulturen (Aufschwemmung von Agarplatten in NaCl-Lösung). Mit diesen OL-Seren wird man dann bei Anwendung lebender Bakterien eine stark körnige Agglutination erhalten und kann durch Absorption dieser Seren mit 100%-Bakterien die L-Antikörper rein darstellen.

### 3. *L-Formenwechsel.*

In der entsprechenden Weise, in der es bei Kulturen mit Vi-Antigen zum V-W-Formenwechsel kommt, d. h. zum Auftreten von Kolonien mit oder ohne Vi-Antigen, die sich nach A. Giovanardi bereits makroskopisch durch das trübere oder klarere Aussehen unterscheiden lassen, kommt auch bei Kulturen mit L-Antigen ein »*L-Formenwechsel*« vor. Die Kolonien mit gut entwickeltem L-Antigen, die L plus-Formen, sehen trübe und matt aus, während die Kolonien ohne L-Antigen, die L minus-Formen, klar und durchsichtig erscheinen. Um diese Unterschiede erkennen zu können, empfiehlt es sich, beide Formen auf ein und derselben Agarplatte zu haben. Ich habe bisher noch keine systematischen Untersuchungen über diesen Formenwechsel angestellt, sondern nur wenige Stämme näher untersucht, zumal das Auftreten von L minus-Formen selten zu sein scheint. Die von mir am meisten benutzte Kultur U 14 lag konstant in der L plus-Form vor, während die Kultur U 5, die ursprünglich in der L plus-Form vorkam, wiederholt L minus-Formen abspaltete, die bei weiterer Fortzucht, auch in der Maus, völlig konstant blieben. Die Massenkultur der L minus-Form vermochte in lebendem Zustande die L-Antikörper des OL-Serum nicht zu absorbieren. Zwi-

schen diesen beiden Formen des Stammes U 5 bestanden deutliche Pathogenitätsunterschiede im Mäuseversuche, worauf wir weiter unten zurückkommen. Im allgemeinen scheinen die Stämme mit L-Antigen sehr konstant zu sein und nur selten L minus-Formen abzuspalten; doch sind zur Klärung dieser Frage noch weitere Untersuchungen erforderlich.

Wahrscheinlich spielen die L-Antigene — genau so wie das Vi-Antigen der Typhus-Kulturen — auch bei der Bacteriophagen-Wirkung eine Rolle; doch wurden bisher keine Versuche in dieser Richtung angestellt. In der entsprechenden Weise, in der spezifische Vi-Bacteriophagen vorkommen, kann man auch mit dem Vorhandensein von besonderen L-Bacteriophagen rechnen.

Gegen Präparate der Sulfonamid-Gruppe verhielten sich O-agglutinable und O-inagglutinable Kulturen einheitlich; betreffs der Technik dieser Versuche sei auf die Mitteilung von F. Kauffmann und K. Schmith verwiesen.

#### 4. Über die Typeneinteilung innerhalb der Coli-Gruppe.

Ich kann hier diese Frage nur kurz streifen, da meine Untersuchungen noch nicht abgeschlossen sind und später veröffentlicht werden sollen. Diese Untersuchungen erstrecken sich auf Coli-Kulturen aus Urin, Blut, Eiter, Galle oder Faeces, die mir teils von Dr. K. Schmith, teils von den pathologischen Instituten des Bispebjerg- und Sundby-Hospitals überlassen, teils hier isoliert wurden.

In der Tabelle 3 sind die Agglutinationsergebnisse von 10 Coli-Kulturen, aus Infektionen der Harnwege, in ihren homologen Seren wiedergegeben, um einige Beispiele für die O-Inagglutinabilität solcher Kulturen zu geben. Soweit es sich bisher beurteilen lässt, kommen unter den aus Krankheitsfällen isolierten Stämmen häufiger O-inagglutinable Kulturen als unter den Faeces-Stämmen vor.

Aus der Tabelle 3 geht hervor, dass von 10 Urin-Stämmen

Tabelle 3.  
Ergebnisse der Reagenzglas-Agglutination.

Stamm	O-Seren agglutiniert mit Kultur		OL-Seren agglutiniert mit Kultur	
	lebend	100 <sup>o</sup>	lebend	100 <sup>o</sup>
U 1	0	5120	640	5120
U 4	0	5120	640	5120
U 5	0	5120	160	5120
U 6	0	5120	160	5120
U 7	0	5120	160	5120
U 8	320	5120	320	2560
U 9	0	5120	320	5120
U 12	160	5120	640	2560
U 14	0	5120	1280	5120
U 18	640	5120	2560	5120

Zeichenerklärung: U1—U18 = 10 Coli-Stämme aus Urin von 10 verschiedenen Patienten mit Infektionen der Harnwege isoliert. Die Agglutinationen wurden mit den zu jedem einzelnen Stamme gehörenden Kaninchen-Immunseren angestellt. lebend = lebende Agarkultur. 100<sup>o</sup> = Bouillonkultur 2½ Std. 100<sup>o</sup> C.

Die Zahlen geben die Agglutinationstiter an. 0 = negativ bei 1:20. Die O-Agglutinationen wurden nur bis zur Verdünnung von 1:5120 angestellt, sodass die O-Titer einzelner Seren noch höher liegen. Die Ablesung der Agglutination mit lebender Kultur erfolgte nach 2 Std. 37° C. und weiteren 20 Std. Zimmertemperatur. Die Ablesung der Agglutination mit 100<sup>o</sup>-Bakterien erfolgte nach 20 Std. Wasserbad 50° C. Zur Ablesung wurde eine Lupe (8fach) benutzt. Bei den O-inagglutinablen Kulturen gibt die Agglutination der OL-Seren mit lebenden Kulturen direkt den L-Titer dieser Seren an (durch Absorptionsversuche bestätigt).

7 völlig O-inagglutinabel waren. 3 dieser Kulturen U 5, U 6 und U 7 gehörten zu einem Typus, d. h. sie besaßen dasselbe O- und dasselbe L-Antigen, waren also durch 2 verschiedene Antigene (O und L) charakterisiert.

Der Stamm U 9 enthielt dasselbe L-Antigen wie die soeben genannten 3 Stämme, hatte aber ein anderes O-Antigen, ab-

geschen von geringen übergreifenden O-Antigenen. Die O-in-agglutinablen Kulturen U 1, U 4 und U 14 besaßen je ein besonderes L-Antigen, ausserdem verschiedene O-Antigene, sodass also unter diesen 10 Kulturen 4 serologisch verschiedene L-Antigene nachgewiesen sind. Will man dieses formelmässig ausdrücken, so kann man die Antigenstruktur dieser 7 Stämme angeben, wie es in der Tabelle 4 geschieht.

Tabelle 4.  
*Diagnostisches Coli-Antigenschema.*

Typ	O-Antigen	L-Antigen	H-Antigen
1	1	1	.
2	2	1	.
3	3	2	.
4	4	3	.
5	5	4	.

Bei der grossen Zahl der zu erwartenden Coli-Antigene empfiehlt es sich, alle Antigene, auch eventuelle H-Antigene, mit arabischen Zahlen zu bezeichnen, sodass also die Formeln der einzelnen Typen folgendermassen geschrieben werden: Typ 1 = O 1, L 1; Typ 2 = O 2, L 1 u. s. w.

Zum Typ 1, dem bisher häufigsten Urintyp, gehören die Stämme U 5, U 6 und U 7. Zum Typ 2 gehört der Stamm U 9, der dasselbe L-Antigen wie der Typ 1 hat. Zum Typ 3 wurde der in Tabelle 1 erwähnte Stamm U 14 gerechnet, während der in Tabelle 7 angeführte Stamm U 1 zum Typ 5 gehört.

In der Tabelle 4 bedeuten identische Zahlen nur dann die Identität der betreffenden Antigene, wenn sie in derselben Kolonne stehen, also z. B. die beiden 1 Zahlen unter dem L-Antigen. Stehen sie in verschiedenen Kolonnen, so haben sie nichts mit einander zu tun.

Durch diese Untersuchungen ist die serologische Typeneinteilung der Coli-Stämme, speziell der pathogenen Stämme, auf eine sichere Grundlage gestellt, sodass nur ein grösseres



Material als das bisher vorliegende dazu gehört, um einen vollständigeren Überblick zu gewinnen. Hierbei müssen in erster Linie die O- und L-Antigene berücksichtigt werden, während die H-Antigene vorläufig unberücksichtigt bleiben können. Wie schon oben erwähnt, sind viele Coli-Stämme unbeweglich oder sehr schlecht beweglich (sowohl bei 37° C. als auch bei 22° C.) und liefern bei Immunisierung mit lebenden Bakterien meist keine H-Agglutinine. Die beweglichen Stämme von »*Salmonella coli*« bilden hiervon eine Ausnahme; doch gehören diese Stämme auf Grund ihres kulturellen Verhaltens nicht in die eigentliche Coli-Gruppe, sodass ihre Zusammenfassung in einer besonderen Gruppe, der »*Salmonella coli-Gruppe*«, auch aus diesem Grunde berechtigt ist.

Die bisherigen Untersuchungen erwecken den Eindruck, dass die Zahl der vorkommenden Coli-Typen, besonders derjenigen, die aus Krankheitsfällen isoliert sind, nicht unbegrenzt ist, sondern auf bestimmte, serologisch erfassbare Typen beschränkt bleibt. Dasselbe gilt wahrscheinlich auch von der grossen Gruppe *coliähnlicher Bakterien*, die Lactose verzögert oder gar nicht spalten. Auch hier habe ich in mehreren Fällen eine ausgesprochene O-Inagglutinabilität und serologisch verschiedene L-Antigene nachweisen können.

Alle serologisch untersuchten Coli-Kulturen wurden gleichzeitig vergärungsmässig untersucht, worüber in einer späteren Mitteilung Näheres berichtet werden soll. Hier sei nur erwähnt, dass es sich kulturell um typische Coli-Stämme handelte, die meist Indol bildeten, Gelatine nicht verflüssigten und mit Hilfe verschiedener Substanzen wie Adonit, Dulcit, Saccharose u. s. w. in verschiedene Vergärungstypen eingeteilt werden konnten. Schleimige Coli-Kulturen oder Stämme der *Lactis aerogenes*-Gruppe wurden aus der vorliegenden Untersuchung ausgeschlossen.

Der grösste Teil der Coli-Kulturen wurde auf ihre Fähigkeit hin, Pferdeblutkörperchen (3mal in NaCl-Lösung gewaschen) zu haemolysieren, geprüft, und zwar sowohl in flüssigen Kulturen als auch auf Blut-Agarplatten. Von wenigen Stämmen abgesehen, war die Mehrzahl der Kulturen

nicht haemolytisch. Auf die sehr umfangreiche Coli-Literatur, speziell mit Hinblick auf eine serologische Typeneinteilung will ich in meiner folgenden Arbeit näher eingehen. Da hier die Beschreibung der L-Antigene im Vordergrund des Interesses steht, erübrigt sich die Berücksichtigung der Literatur, die — soweit mir bekannt — keine Mitteilungen über diese Antigene enthält.

## II. *Mäuse - Versuche.*

### 1. *Die Toxicität der L-Antigene.*

Da sich das L-Antigen in agglutinatorischer Hinsicht ähnlich wie das Vi-Antigen verhält, so war es naheliegend, auch an eine besondere pathogene Wirkung des L-Antigens zu denken. Bekanntlich bedingt das Vi-Antigen der Typhus-Bakterien eine erhöhte Pathogenität für die Maus, da V-Formen deutlich toxischer sind als W-Formen, denen das Vi-Antigen fehlt. Die Pathogenität der Coli-Bakterien für Mäuse entspricht im grossen und ganzen derjenigen der Typhus-Bakterien, da man auch hier nur durch relativ hohe Dosen akute Intoxikationen, die im Laufe von 1—2 Tagen zum Tode führen, erzielen kann. Gibt man geringere, nicht akut tötende Dosen, so erholt sich das Tier schnell und bleibt am Leben. Meine Vermutung, dass die L-Antigene der Coli-Bakterien eine erhöhte Toxicität verursachen würden, konnte durch folgende Versuche bestätigt werden:

Injizierte man Mäusen i. p. lebende Coli-Bakterien der L plus-Form des Stammes U 5 oder lebende Bakterien der L minus-Form desselben Stammes, so traten deutliche Unterschiede hervor, wie es die Tabelle 5 zeigt.

Die Tabelle 5 zeigt, dass die Toxicität der L plus-Form erheblich grösser als diejenige der L minus-Form war. Während bei der L plus-Form noch 50 Millionen eine tödliche Dosis waren, wirkte die gleiche Dosis der L minus-Form nicht tödlich, ja sogar die 10fach grössere Dosis von 500 Millionen tötete nicht alle infizierten Mäuse. Es sei darauf hingewiesen,

Tabelle 5.  
Ergebnisse des Infektionsversuches.

Millionen	Coli U 5 L plus-Form	Coli U 5 L minus-Form
500	2:0	2:1
200	2:0	2:1
100	2:0	2:2
50	2:0	2:2
20	2:1	2:2
10	2:1	.
5	2:1	.
2,5	2:2	.

Zeichenerklärung: 500 Millionen etc. = Zahl der i. p. injizierten lebenden Coli-Bakterien.

L plus-Form = Bakterien mit L-Antigen.

L minus-Form = Bakterien ohne L-Antigen.

2:0 = von 2 Mäusen überlebte keine Maus.

2:2 = beide Mäuse überlebten.

. = nicht untersucht. Die Todesfälle erfolgten im Laufe der ersten beiden Tage.

dass die O-Antigene beider Formen dieselben sind, sodass sich also diese Kulturen nur dadurch von einander unterscheiden, dass die eine das L-Antigen enthält, die andere dagegen nicht. Vergleicht man im Mäuseversuche 2 Coli-Typen mit verschiedenen O-Antigenen, so kann man feststellbare Unterschiede in der Toxicität nicht mit Sicherheit auf das Fehlen oder die Anwesenheit des L-Antigens zurückführen, bevor man nicht über die gleiche Toxicität der beiderseitigen O-Antigene orientiert ist.

Verfolgt man das Schicksal von Coli-Bakterien im Peritoneum von Mäusen, die teils mit einer tödlichen Dosis von Coli-Bakterien der L plus-Form, teils mit derselben, aber nicht tödlichen Dosis der L minus-Form infiziert sind, so kann man folgendes feststellen:

Bei den ersten Mäusen steigt die Zahl der Bakterien im Peritoneum nach 3—5 Stunden stark an und verursacht in

kurzer Zeit den Tod der Tiere; bei den zweiten Mäusen nimmt die Zahl der Bakterien im Peritoneum nach 3—5 Stunden stark ab und führt zu einem Verschwinden der Bakterien, sodass diese Mäuse überleben.

Injiziert man von beiden Formen (mit oder ohne L-Antigen) kleinere Dosen (1 Million Bakterien i. p.) und tötet fortlaufend pro Tag je 1—2 Mäuse, so findet man, dass keine Vermehrung der Bakterien eintritt, sondern dass die Bakterien aus Peritoneum, Lymphknoten, Milz und Leber im Laufe von 1—3 Tagen verschwinden. Es besteht in diesen Versuchen kein Unterschied zwischen den Bakterien mit L-Antigen und denen ohne dieses Antigen, d. h. *kein Virulenzunterschied*, sodass hier die Verhältnisse prinzipiell genau so liegen, wie in den Versuchen von J. Ørskov und F. Kauffmann mit V- und W-Formen der Typhus-Bakterien. Nur darin besteht ein Unterschied zwischen Coli- und Typhus-Bakterien, dass die letzten — unabhängig vom Vi-Antigen — in den Organen der Maus längere Zeit überleben können. Nur wenn man größere Dosen als 1 Million Coli-Bakterien den Mäusen i. p. injiziert, so kann man aus überlebenden Mäusen noch nach 1—2 Wochen bei einem Teil der Tiere die injizierten Coli-Bakterien in Milz oder Leber nachweisen.

## 2. Die immunologische Bedeutung der L-Antikörper.

Da es sich beim L-Antikörper um einen vom O-Antikörper verschiedenen Antistoff handelt, so konnte man vermuten, dass der L-Antikörper — ebenso wie der Vi-Antikörper — eine besondere *antitoxische* Rolle spielen würde. Der in Tabelle 6 wiedergegebene Versuch zeigt, dass dieses tatsächlich der Fall ist.

Aus der Tabelle 6 geht hervor, dass ein OL-Serum besser schützte als ein O-Serum, obwohl die O-Titer beider Seren gleich hoch waren. Es sei besonders darauf hingewiesen, dass man in solchen Versuchen die Seren 1 Tag vor der Infektion geben muss, da bei gleichzeitiger Injektion die Resultate

Tabelle 6.  
Passiver Mäuse-Immunisierungsversuch.

Immunseren i.p. 1 Tag vor der Infektion	Dosis	i. p. Infektion mit Coli U 14	
		200 Millionen	500 Millionen
OL U 14	0,5 cc.	6:6	6:6
„	0,2 „	6:6	6:2
„	0,1 „	6:2	.
„	0,05 „	6:1	.
O U 14	0,5 cc.	6:5	6:1
„	0,2 „	6:0	.
Kontrollen	—	20:2	6:0

Zeichenerklärung:

OL U 14 = Immunserum mit lebenden Bakterien hergestellt.

O U 14 = Immunserum mit 100<sup>0</sup>-Bakterien (2½ Std.) hergestellt.

6:6 = von 6 Mäusen überleben 6 Mäuse.

. = nicht untersucht.

schlechter sind. In allen derartigen Versuchen spielen die quantitativen Verhältnisse eine entscheidende Rolle, sodass man die toxische Wirkung der Kulturen und die antitoxische Wirkung der Seren genau austitrieren muss. Unter geeigneten Versuchsbedingungen kann man auch mit einem reinen O-Serum gegen Coli-Bakterien mit L-Antigen schützen; doch ist ein OL-Serum — wie die Tabelle 6 zeigt — wirksamer.

In einem weiteren passiven Immunisierungsversuche habe ich die Wirkung verschiedener Immunseren auf die Infektion mit dem Stamme U 5 geprüft, dessen Toxicität grösser als die des Stammes U 14 ist. Es wurden 3 verschiedene Immunseren, die mit lebenden Bakterien hergestellt waren, geprüft: U 6, U 9 und U 1. Die Stämme U 5 und U 6 gehören serologisch zu demselben Typus; U 9 hat dasselbe L-Antigen, aber ein anderes O-Antigen, während U 1 sowohl ein anderes O- als auch ein anderes L-Antigen enthält. Alle Kulturen waren O-inagglutinabel. Die O-Titer der Seren waren gleich hoch, die L-Titer beim U 6-Serum 1 : 160, beim U 9-Serum 1 : 320

Tabelle 7.  
Passiver Mäuse-Immunisierungsversuch.

OL-Seren i. p.	Dosis	Antikörper	i. p. Infektion mit U 5 (=O 1, L 1) 200 Millionen
U 6	1,0 cc.	O 1, L 1	4:4
„	0,5 „		4:1
U 9	1,0 cc.	O 2, L 1	4:3
„	0,5 „		4:3
U 1	1,0 cc.	O 5, L 4	4:0
„	0,5 „		4:0
Kontrollen	—	—	4:0

Zeichenerklärung: O 1, L 1 = Antigenformel der Stämme U 5 und U 6. 4:4 = von 4 Mäusen überleben 4 Mäuse. Die Seren wurden 1 Tag vor der Infektion i. p. gegeben.

und beim U 1-Serum 1:640. Der Ausfall dieses Versuches ist in der Tabelle 7 dargestellt.

Die Tabelle 7 zeigt, dass man gegen den Stamm U 5 mit beiden Seren U 6 und U 9, schützen kann, welche dieselben L-Antikörper, aber verschiedene O-Antikörper enthalten. Die Stämme U 5 und U 6 gehören zu einem Typus, während U 9 nur das L-Antigen mit U 5 und U 6 gemeinsam hat. Das Serum U 1 dagegen, das völlig andere O- und L-Antikörper enthält, hatte keine schützende Wirkung.

In Ergänzung und zur Wiederholung des in Tabelle 7 wiedergegebenen Versuches, wurden in einem weiteren Versuche folgende 3 Seren gegenüber einer Infektion mit dem Stamme U 5 geprüft: U 7, U 9 und U 1. Der Stamm U 7 gehört ebenfalls zu demselben Typ (Typ 1) wie die Stämme U 5 und U 6. Das Ergebnis dieses Versuches ist in der Tabelle 8 dargestellt.

Aus der Tabelle 8 geht hervor, dass auch hier die Seren U 7 (= O 1, L 1) und U 9 (= O 2, L 1) gegen eine Infektion mit dem Stamme U 5 (= O 1, L 1) schützten, während das Serum U 1 (= O 5, L 4) versagte.

Tabelle 8.

*Passiver Mäuse-Immunisierungsversuch.*

OL-Seren i. p.	Dosis	Antikörper	i. p. Infektion mit U 5 (=O 1, L 1) 200 Millionen
U 7	1,0 cc.	O 1, L 1	10:9
U 9	„	O 2, L 1	10:8
U 1	„	O 5, L 4	10:1
Kontrollen	—	—	10:1

Zeichenerklärung: 10:9 = von 10 Mäusen überleben 9 Mäuse. Die Seren wurden — wie in den übrigen Versuchen — 1 Tag vor der Infektion gegeben. 1 Maus, die das Serum U 7 erhalten hatte, war bereits vor der Infektion mit dem Stamme U 5 schwer krank, sodass alle 9 Mäuse, die das Serum U 7 erhielten und gesund blieben, die Infektion überlebten.

Tabelle 9.

*Aktiver Mäuse-Immunisierungsversuch.*

Vaccine U 14	Dosis und Datum	Infektion mit U 14 am 21.1.42	
		200 Millionen	500 Millionen
lebend	1) 10 Millionen 5.1.42	6:3	4:0
	2) 20 „ 9.1.42		
	3) 50 „ 13.1.42		
1 Std. 60° C.	1) 50 Millionen 5.1.42	6:2	4:0
	2) 100 „ 9.1.42		
	3) 200 „ 13.1.42		
2½ Std. 100° C.	1) 50 Millionen 5.1.42	6:1	4:0
	2) 100 „ 9.1.42		
	3) 200 „ 13.1.42		
Kontrollen	—	6:0	4:0

Zeichenerklärung: Die Vaccination und Infektion erfolgten intra-peritoneal (i. p.). 6:3 = von 6 Mäusen überlebten 3 Mäuse. 4:0 = von 4 Mäusen überlebte keine Maus. Die Mäuse starben im Laufe von 1—2 Tagen.

Um festzustellen, ob bei aktiver Immunisierung von Mäusen ein besserer Effekt bei Anwendung von lebenden Bakterien mit L-Antigen als bei Anwendung abgelöteter Bakterien zu erreichen ist, habe ich einen Versuch angestellt, der in der Tabelle 9 wiedergegeben ist.

Wie es aus der Tabelle 9 hervorgeht, wurde durch die hier vorgenommene aktive Immunisierung kein völliger Schutz erreicht, doch wirkte die lebende Vaccine, trotz geringerer Keimzahl, am besten.

Ich kann hier nicht näher auf die Beziehungen zwischen Toxizität und Serologie der Coli-Bakterien eingehen, sondern muss auf spätere Mitteilungen aus unserem Institut verweisen. Hier sollte nur dargetan werden, dass neben den O-Antigenen die L-Antigene eine besondere immunbiologische Rolle spielen.

### *Besprechung der Ergebnisse.*

Trotz ausgedehnter Untersuchungen über die Serologie der Coli-Gruppe war bisher keine Klarheit über die gegenseitigen Beziehungen der verschiedenen Stämme gewonnen worden; eine Typeneinteilung mit Hilfe serologischer Methoden fehlte. Der Grund für dieses Misslingen langjähriger Bemühungen verschiedener Autoren darf wohl in dem unregelmässigen Ausfalle der Agglutinationsreaktion, speziell in dem häufigen Vorkommen »inagglutinabler« Stämme, erblickt werden. Durch die vorliegenden Untersuchungen ist diese Inagglutinabilität, die eine *O-Inagglutinabilität* ist, dahin aufgeklärt, dass *neue, thermolabile Körper-Antigene*, die »*L-Antigene*« genannt werden, die Ursache dieser Erscheinung sind. Obwohl die Coli-O-Inagglutinabilität und ihre Ursache, die L-Antigene, äusserlich der Typhus O-Inagglutinabilität und dem Vi-Antigen gleichen, so sind doch beide Antigene, Vi und L, sowohl in ihrer Resistenz als auch in serologischer Hinsicht von einander verschieden. Auch zum  $V_2$ -Antigen (Fünf-Antigen) der Salmonella-Bakterien bestehen keine Beziehungen.

Der Hauptunterschied zwischen dem Vi-Antigen und den L-Antigenen liegt darin, dass die bindende Eigenschaft der



L-Antigene durch 1—2 std. Erhitzung auf 100° C. zerstört wird, sodass man also durch Absorption mit gekochten Coli-Bakterien die L-Antikörper rein darstellen kann. Betreffs weiterer Unterschiede in der Resistenz der verschiedenen Antigene sei auf die Tabelle 2 verwiesen. Will man daher lebende Coli-Bakterien, die L-Antigen enthalten, zur Agglutination bringen, so muss man ein Serum anwenden, das L-Antikörper enthält. Dieses kann man dadurch herstellen, dass man Kaninchen entweder mit lebenden Bakterien oder mit Formalin-Bouillonkulturen (oder auch mit Alcohol-Emulsionen) immunisiert. Solche Seren enthalten 2 Arten von Körper-Agglutininen: O- und L-Agglutinine; und zwar liegen die O-Titer meist erheblich höher als die L-Titer.

Die Bedeutung dieser Tatsachen für die *Coli-Widal-Reaktion* liegt auf der Hand. Will man im Patientenserum O-Agglutinine nachweisen, so muss man mit gekochten Bakterien arbeiten, da lebende Bakterien O-inagglutinabel sein können. Will man L-Agglutinine nachweisen, so muss man lebende Bakterien oder Formalin-Bouillonkulturen benutzen. Ohne Berücksichtigung dieser Dinge müssen alle Widal-Reaktionen mit Coli-Kulturen unzuverlässig sein, wie sie es auch in der Vergangenheit gewesen sind.

Eine *Typeneinteilung der Coli-Gruppe*, speziell der aus Krankheitsfällen isolierten Stämme, muss unter Berücksichtigung der O- und L-Antigene erfolgen, sodass die meisten früheren Versuche auf diesem Gebiete an Bedeutung verloren haben und schwer deutbar sind, besonders wenn der Autor keine näheren Angaben darüber gemacht hat, wie er seine Immunseren hergestellt und seine Agglutinationen angesetzt hat. Wer seine Seren mit 60°-Bakterien herstellte, schaltete hierdurch die L-Antigene aus, erhielt also Seren, die lebende Bakterien der L plus-Form nicht agglutinierten. Wer seine Seren mit lebenden Bakterien herstellte, aber zur Agglutination durch Wärme oder Phenol abgetötete Bakterien benutzte, erzielte ebenfalls keine L-Agglutination, sondern nur O-Agglutinationen. Wer dagegen mit lebenden Bakterien der L plus-Form immunisierte und agglutinierte, hat es mit L-Agglu-

If we call the number of leucocytes in each of the groups  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$ ,  $a_4$  and  $a_5$ , the best index for means below 25 is

$$-4a_1 + 0a_2 + 4a_3 + 10a_4 + 15a_5$$

and for means above 15

$$+2a_1 - 2a_2 + 0a_3 + 3a_4 + 10a_5$$

The relation between this index,  $A'_4$ , and the mean is given in table 3. Table 4 contains the mean errors,  $ME'_4$ , and the values of the fraction  $ME'_4/ME'_1$  are found in table 5. These figures show that the values of the coefficients of the index have been chosen in such a manner that the mean error is practically identical with the mean error of the maximum likelihood estimate.

Taken altogether the suggested grouping means an appreciable improvement which is fully utilised by the new index.

6. There is no doubt that — counted in working hours — it pays to use the grouping; but if the number of leucocytes counted is maintained at 25 the accuracy with which the degree of phagocytosis will be determined will vary widely. An adequate procedure would of course be if the number of leucocytes in each separate case was large enough to give just the accuracy required, an accuracy which should of course be chosen in keeping with the interest adjourned to preparations of various strengths. If, for example, the mean is wanted in every case with an accuracy of  $\pm 5$ , i. e. with a standard deviation of 2.5, the following numbers of leucocytes must be counted if Huddleson's grouping and Foshay and Le Blanc's index are used:

Mean:	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
No. of leucocytes:	12	13	16	14	12	22	30	41	65	109	184

If, on the other hand, an accuracy of  $\pm 20$  per cent. is wanted, i. e. a standard deviation of 10 per cent., the following numbers of leucocytes must be counted:

Mean:	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
No. of leucocytes:	$\infty$	335	99	38	19	22	21	21	26	34	46

It will be seen that *the question whether a constant absolute accuracy, or a constant relative accuracy are sought*

für therapeutische Zwecke (Peritonitis-Behandlung) herstellen kann oder nicht.

Eine weitere Untersuchung ist von meinem Mitarbeiter *H. E. Knipschildt* begonnen worden, der die bei Infektionen der Harnwege vorkommenden Coli-Typen einer serologischen und kulturellen Analyse unterzieht. Wir hoffen, hierdurch einen Einblick in die bisher noch nicht geklärte Entstehung dieser Erkrankungen zu gewinnen.

Im Gegensatz zu der häufig geäußerten Ansicht, dass wir mit Hilfe der Bakteriologie in der Erkenntnis verschiedener Krankheitsursachen nicht mehr weiterkommen können, glaube ich, dass sich auf diesem Wege noch viel erreichen lässt, vorausgesetzt, dass man exakte Typendiagnosen stellt, d. h. die *serologische* Methode mehr als bisher anwendet und weiter ausbaut. Nur mit Hilfe dieser Methode ist die Klarstellung der Coli-Gruppe, die aus zahlreichen, konstanten Typen besteht, zu erwarten.

### *Zusammenfassung.*

1. Es werden neue, *thermolabile Körper-Antigene* der Coli-Bakterien, *L-Antigene* genannt, beschrieben, die sich vom Vi-Antigen in ihrer Resistenz und Serologie unterscheiden.
2. Coli-Kulturen mit voll entwickeltem L-Antigen sind *O-inagglutinabel*, werden aber durch ein Serum, das *L-Agglutinine* enthält, agglutiniert.
3. *OL-Immunseren* können durch Immunisierung von Kaninchen mit *lebenden* Bakterien oder mit Formalin-Bouillonkulturen hergestellt werden.
4. Durch Erhitzung auf 60—100° C. werden die agglutinablen, *agglutininbindenden* und agglutinogenen Eigenschaften der L-Antigene beseitigt; gleichzeitig verschwindet hierbei die O-Inagglutinabilität der Coli-Bakterien.
5. Die *Resistenz-Unterschiede* der bisher bekannten Antigene

- werden in einer Tabelle zusammengestellt, nach der die Labilität der L-Antigene am grössten ist.
6. Zur *Widal-Reaktion* mit Coli-Bakterien sind für den Nachweis von O-Agglutininen gekochte Bouillonkulturen, für den Nachweis von L-Agglutininen lebende Bakterien anzuwenden.
  7. Zur *serologischen Typenbestimmung* von Coli-Kulturen sind in erster Linie die O-Antigene zu berücksichtigen. Die H-Antigene spielen eine untergeordnete Rolle, da sie oft schlecht entwickelt sind oder fehlen.
  8. Coli-Kulturen, die dasselbe L-Antigen besitzen, können verschiedene O-Antigene enthalten.
  9. Es kommt ein *L-Formenwechsel* vor, d. h. es treten selten in O-inagglutinablen Kulturen mit L-Antigen Kolonien ohne dieses Antigen auf, die O-agglutinabel sind und makroskopisch an ihrer grösseren Durchsichtigkeit erkannt werden können.
  10. Die O-inagglutinablen Formen einer Kultur mit L-Antigen sind für die Maus von *grösserer Toxizität* als die O-agglutinablen Formen ohne L-Antigen.
  11. Die pathogene Wirkung von Coli-Bakterien auf die Maus, die vorwiegend eine *toxische* ist, beruht auf der *kombinierten Wirkung* der O- und L-Antigene. Ob daneben noch andere Toxine vorkommen, erscheint fraglich.
  12. Bei der *aktiven und passiven Immunisierung* der Maus sind die L-Antigene von Bedeutung, da dem L-Antikörper eine *besondere, schützende Wirkung* zukommt.
  13. L-Antigene, die eine O-Inagglutinabilität bedingen, kommen auch in der *Gruppe coliähnlicher Bakterien* vor, d. h. bei Stämmen, die Lactose spät oder gar nicht spalten.
  14. Die *»qualitative Rezeptorenanalyse«* darf sich nicht nur auf die Unterscheidung zwischen O- und H-Antigenen beschränken, sondern muss auch die verschiedenen *thermolabilen Körperantigene*, die sowohl diagnostische als auch immunologische Bedeutung haben, erfassen.
  15. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob es eine *be-*

*stimmte Gruppe menschenpathogener Coli-Typen* gibt, und ob den *L-Antigenen* in dieser Hinsicht eine besondere Bedeutung zukommt.

## LITERATUR.

- Felix, A.* und *S. S. Bhatnagar*: Brit. J. Exp. Path. 16, 422, 1935.  
 — *S. S. Bhatnagar* und *R. M. Pitt*: Brit. J. Exp. Path. 15, 346, 1934.  
 — und *R. M. Pitt*: J. Path. Bact. 138, 409, 1934.  
 — — Lancet 1934, II, 186.  
 — — J. of Hyg. 35, 428, 1935.  
 — — Brit. J. Exp. Path. 17, 81, 1936.  
*Giovanardi, A.*: Z. Bakt. 144, 341, 1938.  
*Kauffmann, F.*: Z. Hyg. 117, 778, 1936.  
 — Z. Hyg. 118, 318, 1936.  
 — Acta Path. et Microbiol. Scand. 18, 225, 1941.  
 — »Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe«, bei Einar Munksgaard, Kopenhagen 1941.  
 — und *K. Schmith*: Acta Path. et Microbiol. Scand. (im Druck).  
*Ørskov, J.* und *F. Kauffmann*: J. of Hyg. 36, 514, 1936.  
 — — Z. Hyg. 119, 65, 1936.

(FROM THE INSTITUTE OF LEGAL MEDICINE, UNIVERSITY  
OF COPENHAGEN. CHIEF: PROFESSOR KNUD SAND).

## CONTRIBUTION TO THE DISCUSSION ON THE PRESENCE OF ANTIGEN AND THE CORRESPONDING ANTIBODY WITHIN THE SAME ORGANISM.

By *G. Hartmann* and *V. Friedenreich*.

(Received for publication March 28th, 1942).

### 1) *Introduction.*

When antigens are brought into an organism in which they were not originally present it certainly often happens that both the antigens and the antibodies they produce are present separately in this organism. One need only mention the cases of a positive serological reaction where the bacteria which give rise to the antibody production, are still alive, e. g. gonococci and a positive reaction of the complement fixation test.

The question whether antigen and antibody can exist together separately in the blood has most often been answered in the negative (*H. G. Wells*) in so far as this phenomenon has been observed with certainty only when the antigens used were of a complex character, such as horse serum and albumen of eggs. In such cases the antibody produced was also a complex, of which the various parts were present in different concentrations. In such a mixture of antigens and antibodies one can never control which antibodies and antigens correspond to each other. Most probably the antigens and antibodies remaining free after the reaction have not corresponded but formed a surplus after the various independent reactions have taken place.

However, some observations by *Cruickshank* should be noted in this connection. They deal with the excretion of the specific polysaccharides of types I, II and III pneumococci in the urine of patients with lobar pneumonia. It was observed that in a good many non-fatal cases an excretion of the specific polysaccharide started in convalescence, thus at a time when a high concentration of antibody was normally found in the serum. The author's hypothesis that the polysaccharides were freed from the antibody in small amounts and then conveyed to the kidneys, assumes that the antigen and the antibody are found together in the serum of the patients. *Cruickshank* attributes the finding of no trace of the polysaccharide there to the minute concentration of the antigen. However, since in this case the antigen and the antibody are only assumed to exist together it may just as well be supposed that the separation of the antigen-antibody complex does not take place until it passes the kidneys.

These examples dealt with the interaction between an antigen, foreign to the organism, and its antibody. However, it might probably be questioned whether a normal antigen and its corresponding antibody can or may be present in the organism to which the antigen belongs.

Since the very early days of immunology the »horror auto-toxicus« thesis of *Ehrlich* has more or less been taken for granted. In this thesis it is maintained that an antigen will never be able to produce a specific antibody in an organism of which it forms a normal constituent itself. Though numerous experiences in serology favoured this thesis there were a few examples which might give rise to some doubt as to whether this law was absolute.

First some of the observations and hypotheses made to explain the Wassermann reaction should be remembered. *Sachs* and other authors maintained that the Wassermann reaction is a reaction between lipoids found in every human being and the antibodies specific for these haptens. Thus, if the theory holds good so that the Wassermann reaction represents a real antigen-antibody reaction it is seen that in connection with the syphilitic infection an immunisation against antigens belonging to the organism proper would seem to take place. *Sachs* in connection with this explanation draws attention to the fact that lipoids from rabbits mixed with pig serum produce antibodies for these lipoids when injected in other rabbits. Another example is given in some experiments by *Metalnikoff* (1910). This author immunised some guinea pigs with an emulsion of sperm from the animals themselves and in this way produced an »autospermotoxin« which in vitro reacted

with sperm from the animal but left the sperm in the organism quite uninfluenced as regards their vitality.

During some experiments the authors of this paper made with an A-like antigen found in saliva and organs from cows they discovered that in the same animal both this antigen and an anti-A in the serum would often be present together. Thus it would seem that an example was found of an organism containing an original antibody against an antigen which forms a normal constituent of this organism. Further that the two substances, the antigen and the antibody, do not influence each other in vivo. The details and a possible explanation will be given below.

## 2) *The A-antigen and the anti-A in cows and the reactions between the two substances.*

In another paper by one of the authors (*Hartmann*) the character and distribution of the A-antigen found in cows have been discussed. This antigen was found to be serologically very closely related to the human A-antigen. Within the various animals the concentration of antigen differs a good deal but is seldom absolutely zero. This concentration seems to rest on a genetical basis and to show some similarity to the  $A_1$ - $A_2$ - $A_3$ - $A_4$  blood group system in man. The A-antigen is found as a constituent in a great many organs but particularly developed in the glandular cells and in the secretions of the digestive system. In the blood corpuscles it is not present at all. At the same time it is observed that a good many cows exhibit, in their sera, an antibody which is not distinguishable from human iso-anti-A. Thus it would seem natural to compare the strength of this antibody with the concentration of the A-antigen in various cows. Such a comparison was carried out independently by each of the authors. In both series of observations saliva from the cows was used as the source of the A-antigen. Corresponding samples of saliva and serum from 206 cows were examined with regard to their content of A-antigen and anti-A respectively. (*Friedenreich*: 69 observations. *Hartmann*: 137 observations). It would perhaps seem hazardous to choose a substance like saliva as an indicator for the antigen content in the organism



since the concentration of antigen might be supposed to differ greatly from time to time. In a previous work (5) this has been investigated and it turned out that the concentration showed very small variations when the animal was more than one year old. On the other hand, it was discovered that the concentration in saliva does not always run exactly parallel to the concentrations in organs (duodenum).

The amount of A-antigen was determined in an agglutination inhibition test with an iso-anti-A as serum. This serum was different in the two sets of observations. The way of determining the antigen concentration was the same in both investigations: two series of small test tubes were used in the determination of the antigen content of each sample. In the first tube of each series 0.1 cc of the saliva was introduced (concentration 1). In the second tube of each series 0.1 cc of a concentration  $\frac{1}{2}$ , in the third 0.1 cc of a concentration  $\frac{1}{4} = \frac{1}{2}^2$ , in the fourth 0.1 cc of a concentration  $\frac{1}{8} = \frac{1}{2}^3$ , etc. Thus in tube number  $n$  0.1 cc of an antigen solution of concentration  $\frac{1}{2}^{n-1}$  was introduced. Hereafter 0.1 cc of the serum anti-A was introduced into all the tubes of one of the two series, while 0.1 cc of a serum anti-B was added to the contents of all the tubes of the other series. Thus after this operation the antigen concentrations in the tubes of each of the two series were  $\frac{1}{2}^1, \frac{1}{2}^2, \frac{1}{2}^3, \dots, \frac{1}{2}^n$ . In the experiments the iso-anti-A Ulla  $\frac{1}{16}$  was employed by *Hartmann*, the iso-anti-A Johs.  $\frac{1}{8}$  by *Friedenreich*. Different iso-anti-B sera were employed, but no reaction with anti-B was ever found. After the introduction of serum the test tubes were kept at about 20° C for an hour when washed blood corpuscles of group A<sub>1</sub> and B were added, the A<sub>1</sub> blood corpuscles to the test tubes with serum iso-anti-A, the B blood corpuscles to the test tubes with serum iso-anti-B. After two hours the tubes were shaken. In one of the two series agglutination was seen to take place in all the tubes (generally the series with anti-B), while in the other, agglutination only occurred in the tubes following a certain number  $n$  (the series with anti-A). The number  $n$  is taken as a

measure of the antigen concentration in the saliva and is termed the titer reading for this sample. It may be noted that  $n$  is the power of two in the expression for the antigen concentration in tube number  $n$  after the addition of serum.

The concentration of the serum anti-A was determined in the following way. After absorption with blood corpuscles of group O and B in the ratios  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ , the serum was examined for its ability to agglutinate blood corpuscles of group A. This ability was read on a scale of serum concentrations  $\frac{1}{2}^0$ — $\frac{1}{2}^1$ — $\frac{1}{2}^2$ — $\frac{1}{2}^3$ ..... $\frac{1}{2}^n$ . The strength or ability was indicated as  $n'$ , when  $n'$  was the last tube in which agglutination of the blood corpuscles still took place. In *Friedenreich's* observations the readings were made both at 20° C. and at 37° C. The absorptions also were generally carried out at both of these temperatures, in only four cases was a reduced titer found at 37° C. (indicated by crosses in the table). This anomaly was, however, undoubtedly due to the fact that in these four cases the sera were rather old. So in the observations by *Hartmann* the operations were carried out at 20° C. only. The complete material from the experiments is given in Table I a—b.

In order to see whether a more or less simple correlation exists between the amounts of antigen and antibody, a diagram, fig. 1, comprising all the average values of the corresponding samples was drawn. Thus an attempt is made to produce a curve showing the average variation of the content of antigen in the saliva with the concentration of anti-A in the serum. For this purpose the experimental material (saliva) from each observation was divided into groups covering two titers. The average antibody concentration was calculated from each group. The results are stated in Table II and further represented in fig. 1 where the abscissa is the average concentration of the antibody, and the ordinate the average concentration of the corresponding antigen. First of all it must be noticed that the two independent sets of observations give rise to entirely similar results and that the same curve will result from the values found by each author

Table I a.

Comparisons between the Concentrations of A-Antigen in Saliva from a Random Group of Cows and the Concentrations of Anti-A in the Serum from the same Subjects.

Number of the Cow	Saliva Titer n	Serum Anti-A Content	Number of the Cow	Saliva Titer n	Serum Anti-A Content
F 11	0	3	F 50	6	0
F 12	0	5	F 51	0	3
F 13	0	7	F 52	0	4
F 14	6	1	F 53	0	5
F 15 a	0	1	F 54	0	5
F 15 b	7	3	F 55	5	1
F 16	9	0	F 56	0	6
F 17	6	0	F 57	0	5
F 18	0	7	F 58	0	3
F 19	0	4	F 59	0	5
(X) F 20	5	4	F 60	0	5
F 21	0	2	F 61	0	7
F 22	10	0	F 62	6	2
(X) F 23	4	5	F 63	2	7
F 24	0	2	F 71	9	1
F 25	5	0	F 72	2	1
(X) F 26	2	4	F 73	0	0
(X) F 27	0	4	F 74	0	2
F 28	0	6	F 75	10	0
F 29	0	6	F 76	0	1
F 30	6	1	F 77	0	0
F 31	7	3	F 78	4	2
F 32	0	4	F 79	0	5
F 33	0	7	F 80	9	1
F 34	0	3	F 82	0	2
F 41	2	3	F 83	8	0
F 42	3	0	F 84	2	6
F 43	4	2	F 85	0	6
F 44	7	1	F 86	5	1
F 45	9	2	F 87	0	7
F 46	5	2	F 88	0	2
F 47	0	7	F 89	6	3
F 48	0	2	F 90	0	8
F 49	11	2	F 91	0	7

Table I b.

Number of the Cow	Saliva Titer n	Serum Anti-A Content	Number of the Cow	Saliva Titer n	Serum Anti-A Content	Number of the Cow	Saliva Titer n	Serum Anti-A Content	Number of the Cow	Saliva Titer n	Serum Anti-A Content
H 1	0	5	H 36	1	4	H 71	0	4	H 106	3	1
H 2	0	3	H 37	0	3	H 72	0	2	H 107	1	2
H 3	0	6	H 38	2	2	H 73	7	1	H 108	4	0
H 4	7	1	H 39	3	3	H 74	1	5	H 109	0	4
H 5	5	3	H 40	0	4	H 75	0	6	H 110	0	3
H 6	2	5	H 41	7	1	H 76	0	3	H 111	9	0
H 7	6	2	H 42	2	5	H 77	4	1	H 112	6	2
H 8	1	5	H 43	0	2	H 78	1	3	H 113	4	2
H 9	0	2	H 44	0	4	H 79	0	2	H 114	1	3
H 10	1	5	H 45	2	3	H 80	0	2	H 115	0	6
H 11	2	2	H 46	6	2	H 81	2	2	H 116	0	4
H 12	2	0	H 47	0	2	H 82	4	1	H 117	4	7
H 13	0	3	H 48	6	2	H 83	0	5	H 118	0	3
H 14	2	1	H 49	1	5	H 84	1	3	H 119	1	4
H 15	0	6	H 50	8	3	H 85	3	0	H 120	0	7
H 16	2	2	H 51	7	4	H 86	0	4	H 121	2	5
H 17	0	4	H 52	6	2	H 87	0	3	H 122	0	4
H 18	4	3	H 53	0	5	H 88	0	3	H 123	3	4
H 19	2	2	H 54	0	3	H 89	4	1	H 124	0	4
H 20	1	3	H 55	6	3	H 90	0	4	H 125	0	2
H 21	1	2	H 56	4	4	H 91	2	3	H 126	6	2
H 22	0	1	H 57	1	6	H 92	0	3	H 127	5	2
H 23	1	4	H 58	0	6	H 93	0	7	H 128	4	1
H 24	1	3	H 59	0	3	H 94	1	3	H 129	7	2
H 25	4	2	H 60	0	2	H 95	0	6	H 130	5	2
H 26	1	1	H 61	0	3	H 96	3	3	H 131	3	3
H 27	0	2	H 62	3	1	H 97	5	2	H 132	1	6
H 28	0	3	H 63	0	3	H 98	1	4	H 133	2	3
H 29	1	4	H 64	0	5	H 99	0	6	H 134	1	4
H 30	0	2	H 65	0	4	H 100	3	2	H 135	2	5
H 31	0	4	H 66	0	2	H 101	8	0	H 136	6	2
H 32	1	4	H 67	0	4	H 102	0	5	H 137	0	5
H 33	1	3	H 68	2	2	H 103	4	1			
H 34	4	3	H 69	7	3	H 104	4	3			
H 35	6	2	H 70	1	2	H 105	1	4			

Table II.

The Correlation between the Concentration of A-Antigen in Saliva from Cattle and the Concentrations of Anti-A in Serum from the Corresponding Subjects.

Saliva Concentration of A-Antigen, Titer n	V. F.'s Observations		G. H.'s Observations	
	Corresponding Serum Concentration of Anti-A	Number of Observations	Corresponding Serum Concentration of Anti-A	Number of Observations
0—1	4.2	38	3.7	79
2—3	3.3	7	2.6	24
4—5	2.1	7	2.4	17
6—7	1.6	9	2.1	14
8—9	0.8	5	1.0	3
10—11	0.8	3	—	—
Total Number of Observations:		69		137

independently. With regard to the character of the curve it may be said that in spite of the scanty material within the groups containing the higher antigen concentrations the curve is rather regular, showing a steady decrease of the concentration of A-antigen with an increasing concentration of the anti-A.

The simplest curve which may be taken to represent the two sets of observations in fig. 1 is obviously a straight line. It would seem that the observations are distributed most evenly round the full-drawn curve. The equation of this curve is

$$1) \quad n + 3.25 \, n' = 12.3.$$

Almost as good a solution of the problem of smoothing out the indefiniteness is, however, the dotted curve with the simple equation

$$2) \quad n + 3 \, n' = 12.$$

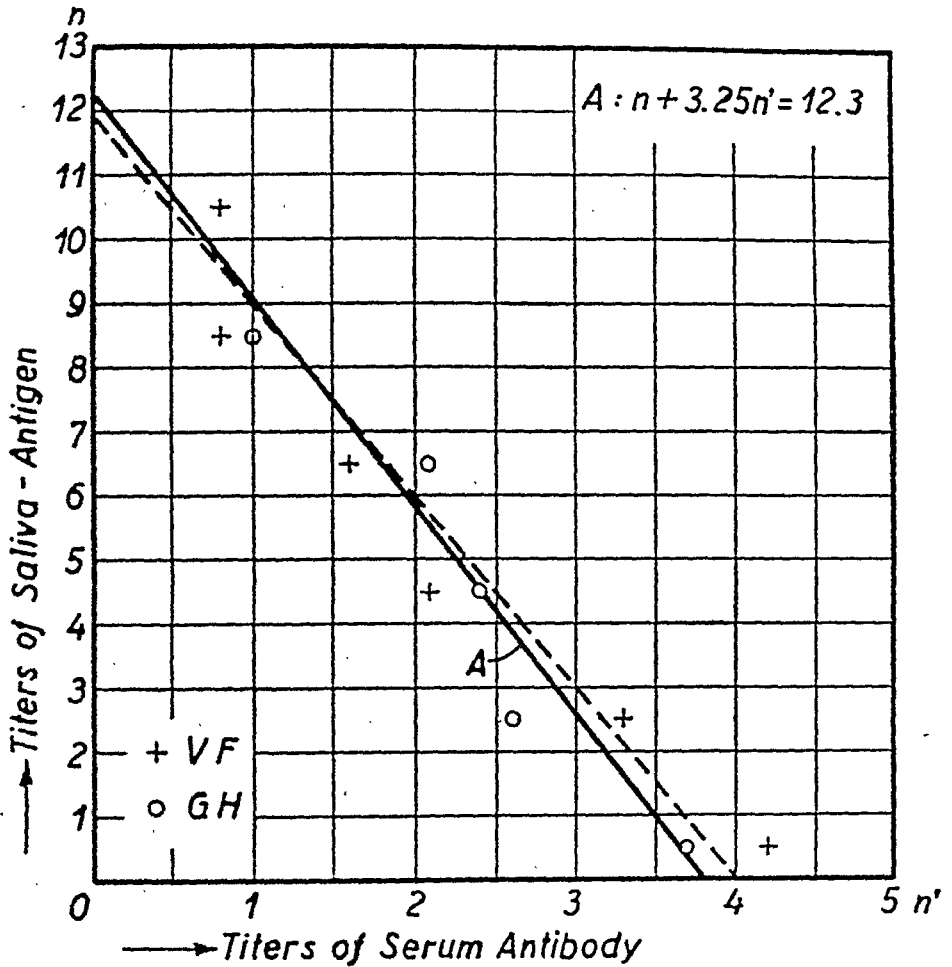


Fig. 1.

Let  $C_A$  and  $C_S$  be the concentrations of antigen and antibody respectively, then equation 2) is equivalent to the equation

$$3) \quad C_A \cdot C_S^3 = \text{constant} = K$$

a suitable value of  $K$  being assumed. For seeing that

$$4-5) \quad C_A = \frac{C_{Ao}}{2n} \quad \text{and} \quad C_S = \frac{C_{So}}{2n'}$$

3) may be rewritten as

$$1a) \quad \frac{C_{Ao} \cdot C_{So}^3}{2n + 3n'} = K$$

from which it follows that

$$4) \quad n + 3n' = \log \left( \frac{C_{Ao} \cdot C_{So}^3}{K} \right) / \log 2 = \text{constant}.$$

One can hardly escape the conviction that  $n$  and  $n'$  are actually interrelated in the way here found, seeing that two quite independent series of observations have led to much the same straight line.

On the other hand the authors fail to see what interpretation should be put on this interdependence of  $n$  and  $n'$ , particularly perhaps on that represented by formula 3).

Compared with Table I these average results diverge much from the single observations, from which scarcely anything can be concluded.

However, these results tell us nothing about a question of main interest, namely whether the A-antigen from the single cow reacts with the anti-A from its own serum and how intensely. In 76 cases, suitable for this purpose, such a test was carried out. In a double set of agglutination inhibition tests the saliva from the cow itself was used as A-antigen in both sets; as antibody in the first set, however, the serum from the same cow, and in the other a human iso-anti-A. This serum was the same throughout all 76 investigations. As far as possible the bovine sera were diluted so that the concentration of anti-A was the same as in the human iso-anti-A. The results are given in a diagram fig. 2.

In this diagram the titers for the antigen concentration obtained by using the cow's own serum can be read on the axis of the abscissa, those obtained with the human iso-anti-A on the ordinate. Further a straight line at an angle of  $45^\circ$  is drawn, indicating the line around which the points would be dispersed if complete identity obtained in the affinity between the antigens and the two different sorts of sera (the human iso-anti-A and the bovine sera). Though there is a tendency towards such a distribution, it cannot be

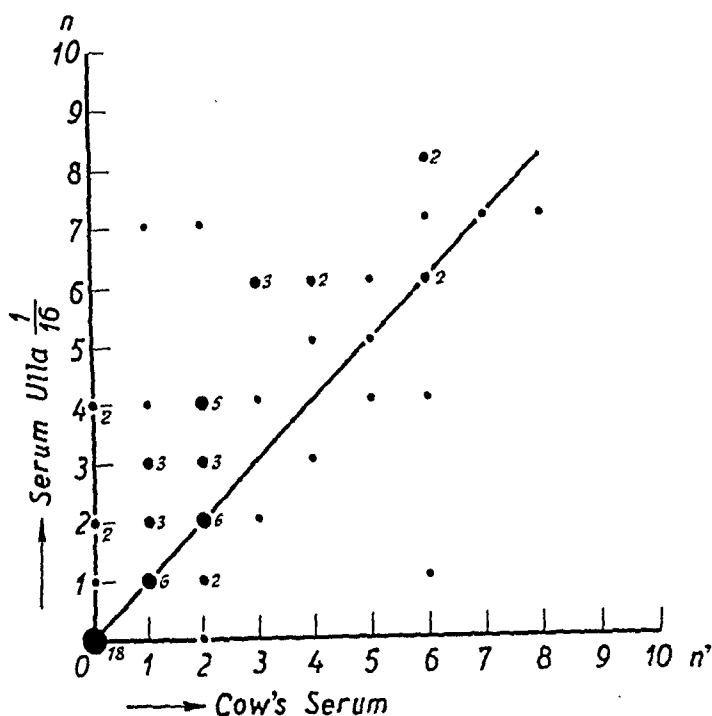


Fig. 2.

denied that relatively many saliva samples exhibit a greater affinity to the iso-anti-A than to the cow's own serum. Still no case was found in which there was a strong reaction to the iso-anti-A when no reaction could be obtained with the bovine serum. Thus the possibility of the corresponding antibody for the A-antigen in cattle being present only apparently must be dismissed. It may, then, be concluded that we are here dealing with a case in which a normal antibody corresponding to an antigen (or hapten) is present and where the latter constitutes a normal substance of the same organism in which the antibody is found. If no reaction had taken place between the A-antigen from the cow and its own serum, it must be assumed that the anti-A had been of a complex character, and that the various quantitatively different A groups in cattle were also serologically different just as the  $A_1$  and  $A_2$  groups in man. The case would then have



Table

Comparisons between the quantitative Effects of a) Cow Saliva on  
b) Human Saliva on Human Iso-anti-A and on Anti-A preformed

Saliva from Cow	Titer n								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Calf Terp	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Cow Calf Terp 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 (+)	(+) +	+	+(+)	++ +++
Cow 117	0 0	(+) 0	+	+(+) +	++ +(+)	+++ ++	+++ +++	+++ +++	
Cow Calf Terp 97	0 0	0 0	(+) 0	+	+	+(+) +(+)	++ ++	+++ ++	+++ +++
Calf Terp 149	0 0	0 0	(+) 0	+	+(+) +	++ +(+)	+++ +(+)	+++ ++	+++ +++
Calf 1 C. W.	0 0	0 0	0 0	(+) 0	+	+(+) (+)	+(+) +(+)	++ ++	+++ +++
Calf 12 H. A.	0 0	0 0	0 0	0 0	0 +	(+) +	+	+(+) +++	++ +++
Cow 97	0 0	0 0	(+) 0	+	+(+) +(+)	++ ++	+++ +++	+++ +++	
Bull Terp	0 0	(+) 0	+	++ (+)	+++ +	+++ +(+)	+++ ++	+++ +++	+++ +++
Cow Calf Terp 164	0 0	0 0	(+) 0	+	+(+) +	++ +(+)	+++ ++	+++ ++	+++ +++
Calf 66 B. L.	0 0	0 0	0 0	0 0	(+) +	+	++ ++	+++ +++	+++ +++
Bull Kallehave	0 0	0 0	0 0	0 (+)	(+) +	+	++ +++	+++ +++	+++ +++
Cow 75	0 0	0 0	0 0	(+) (+)	+	+(+) +(+)	++ ++	+++ +++	+++ +++



(Table III b)

Human Saliva from:	Titer n													Se- rum	
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		18
S. Group A <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	0	(+)	+	+(+)	++	+++	+++			Ulla Cow 2
	0	0	0	0	0	(+)	(+)	+	+(+)	++	+++	+++			
K. Group A <sub>1</sub>	0	0	0	(+)	+	+(+)	++	+++	+++	+++	+++				Ulla Cow 2
	0	0	0	(+)	+	+(+)	(+)	++	+++	+++	+++				
L. Group A <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	(+)	+	+(+)	+++	+++	+++				Ulla Cow 2
	0	0	0	0	0	+	+(+)	+++	+++	+++	+++				
K. Group A <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	0	0	(+)	+	+(+)	++	+++	+++	+++	Ulla Cow 2
	0	0	0	0	0	0	0	0	(+)	+	+++	(+)	+++	+++	
M. S. Group A <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(+)	+(+)	Ulla Cow 2
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
H. Group A <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	+(+)	++	+++	+++			Ulla Cow 2
	0	0	0	0	0	0	(+)	+	+(+)	++	+++	+++			
V. F. Group A <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	0	(+)	+	+	++	+++	+++			Ulla Cow 2
	0	0	0	0	0	0	+	+++	+(+)	++	+++	+++			
K. B. Group A <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	(+)	+	++	+++	+++	+++	Ulla Cow 2
	0	0	0	0	0	0	(+)	+	+	++	+++	+++	+++	+++	

been identical with the case of *Morville* (1928) where an AB child (certainly  $A_2B$ ) had an anti-A reacting with other A blood corpuscles. The antibody was probably  $\alpha_1$  and thus not at all an antibody corresponding to the  $A_2$  antigen, at that time unknown. Now the inhomogeneity in the original strength of the bovine sera may to some extent be the cause of the irregular distribution curve. In order to compare a more similar cow serum with the applied iso-anti-A a relatively strong cow serum was chosen and diluted so that it contained the same anti-A concentration as the iso-anti-A Ulla  $1/16$ . Then both sera were tested as to their agglutination-inhibition reaction to several salivas from cows and from persons belonging to group  $A_1$ . It turned out (Table III) that with this particular cow serum at least no quantitative or qualitative difference could be established between bovine and human anti-A sera.

### 3) Discussion.

From these investigations it can scarcely be doubted that we are here dealing with an antigen and its true corresponding antibody present in the same organism, and where immunisation does not play any part in the production of the antibodies.

The chief problem will then be to find out how this may be explained in accordance with the normal biological laws.

It may be asked how it can be possible to find in cattle such neighbourliness between the antigen and its antibody, especially while in man, who in the blood group system possesses very similar antigens, it is never found that a person of group  $A_1$  has anti-A in his serum. Are there differences in the antigen systems within the two organisms which may explain the fundamental difference as regards the antibodies?

The theory of *Bernstein* and of *Friedenreich* concerning the formation and regulation of the iso-antibodies may well be applied to this case because here there actually exists different conditions for the intravital fixation which may

explain why anti-A can be present in cattle and not in man of group A. As briefly mentioned before, the A-antigens in cows are especially developed in the glandular organs of the digestive system and are never found in the blood corpuscles, which is one of the characteristic finding places for group antigens in man. Still the difference in the distribution of the antigens in the two organisms is deeper than this distinction in finding-places directly indicates. For investigations by *G. Hartmann* would seem to show that within the human group antigens it is necessary to distinguish between two physiological forms of state, an alcohol-soluble and a water-soluble form of the antigen. In the membranes of the blood corpuscles and only there is the alcohol-soluble form found isolated, while in the secretions only water-soluble antigens are present. In the organs of man the two forms are mixed together, yet in such a way that there is some evidence that the alcohol-soluble antigens form a constituent of the walls of the cells, while the water-soluble antigens are found in the interior of the cells. Now in cows the A-antigens found in the organs are nearly all water-soluble and only within the organs of the digestive system are alcohol-soluble antigens found, though of a lower titer than averagely found in man. Thus it would seem natural to suppose that the A-antigens in cattle (judging by the experience gained from man) are confined chiefly to the inner part of the cells, and thus they are in no direct contact with the blood or serum antibodies. This is quite otherwise in man where, apart from the cell walls containing antigens, all the blood corpuscles are permanently in touch with the antibodies possibly present. Under such circumstances free antibodies corresponding to the group antigens would not be likely to be found. On the other hand, it may be discussed whether in the case of cattle the barrier consisting of the cell walls can be regarded as sufficient to prevent a reaction between the two substances. Theoretically this must be answered in the affirmative, since the antigens are considered as polysaccharides and the antibodies are connected with serum globulines, both assumed unable

to penetrate cell membranes. However, in vivo these experimental observations do not always hold good, as it is seen when maternal antibodies pass through the single layer of cells separating the maternal and the fetal circulations in the placenta. Likewise when the highmolecular enzymes pepsinogen and trypsinogen in small quantities are secreted the wrong way into the circulation of the blood. Beside these possibilities, which would certainly quantitatively be of minute importance, it must be considered that from time to time antigens enclosed in the inner part of the cells must nevertheless pass into the circulation, namely at the physiological cell destruction. Thus it must be assumed that a barrier really exists, but that in spite of this antigens continually pass in smaller or greater amounts, corresponding to the average antigen concentration of the animal, into the circulation, due to the normal cell destruction. Now the question is whether these theoretical reflections agree with the experimental findings. The agreement is as good as could be expected. As will be remembered, it was observed that the average concentration of antibody within a larger group of cows is small when the average antigen concentration is high, and conversely. This law would be inconceivable if we were concerned with »an absolute barrier« where the antigen and the antibody would have no connection or influence on each other. On the other hand, that the law only holds good as an average law is only to be expected from what is known about the concentrations of the antibody and the saliva antigen within the single organism. It has been mentioned before that the concentration of antigen in saliva only with great uncertainty reflects the antigen concentration of the organism. Also, as is well known, the ability of various organisms to produce antibodies is rather variable. With these two indefinite factors it must actually be expected that a rather large material will be necessary to see the influence of a high antigen concentration on the amount of free antibody in the serum. Thus it would seem that the experimental

findings in this work on no point disagree with what has already been assumed before and might have been foreseen as a possibility.

#### 4) Summary.

The paper discusses the question of the presence of an antigen and its corresponding antibody within the same organism. This question was taken up for discussion because it was demonstrated that cattle normally possessed a substance in their secretions which in vitro reacted with an antibody generally present in the cow serum.

The presence of these two substances together was ascertained in a great many instances and their reaction with each other outside the organism was tested by means of the agglutination-inhibition test.

It was maintained that the reason why the antigen and the antibody could exist together was, that in the organism they were separated by a barrier. This barrier was, for several reasons, not to be considered as absolute.

The experimental findings were in good agreement with the theory.

#### REFERENCES.

- 1) *Felix Bernstein* (1925): »Zusammenfassende Betrachtungen über die erblichen Blutstrukturen des Menschen«. Zeitschr. f. induct. Abstammungs- und Vererbungslehre. 37, p. 237—270.
- 2) *Robert Cruickshank* (1938): »The Urinary Excretion of Pneumococcus Polysaccharide in Lobar Pneumonia«. Journ. of Path. and Bact. 46, p. 67—75.
- 3) *V. Friedenreich* (1931): »Wie wird das Vorkommen der Isoagglutinine reguliert?« Zeitschr. f. Immun. 74, p. 314—330.
- 4) *A. Gammelgaard & P. V. Marcussen* (1940): »Nachweis eines vierten allelomorphen A-Gens (A<sub>4</sub>)«. Zeitschr. f. Immun. 98, p. 411—419.

- 5) *Grethe Hartmann* (1941): »On the Occurrence of Human-Like A-Antigens in Cattle«. Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab. Biol. Medd. XV, 10.
- 6) — (1941): »Group Antigens in Human Organs«. Copenhagen.
- 7) *S. Metalnikoff* (1910): »Die schützende Rolle der Hoden und der Nebenboden«. Zeitschr. f. Immun. 7, p. 185—190.
- 8) *P. Morville* (1928): »Undersøgelser over Isohæmagglutinin hos Modre og Nyfødte«. København.
- 9) *H. Sachs* (1925): »Zur Theorie und Methodik des serologischen Luesnachweises«. Klin. Wochenschr. 4, p. 1630—1633.
- 10) *H. G. Wells* (1927): »Die chemischen Anschauungen über Immunitätsvorgänge« (Deutsch von R. Wigand). Jena.



ON THE DETERMINATION OF  
THE PHAGOCYTTIC POWER OF LEUCOCYTES.  
A STUDY IN ECONOMICAL DESIGN OF EXPERIMENTS.

By *A. Hald, M. Jersild and G. Rasch.*

(Received for publication April 10th, 1942).

1. In serology the phagocytic power of leucocytes for some bacterium or other is often used as a measure of the amount of antibody against this bacterium found in the blood. Various methods have been described for the determination of the intensity of the phagocytosis, i. e. for determining to what degree the leucocytes are able to absorb bacteria.

Normal blood usually presents a certain power to stimulate phagocytosis, which indicates the presence of normal opsonin. If it is to be determined whether a blood sample contains immune opsonin, the phagocytosis here must of course be compared with normal phagocytosis in order to ascertain whether there is a significant rise. Wright's opsonic index gives a measure of the rise, it being the phagocytic count of the serum examined (i. e. the average number of bacteria absorbed per leucocyte) divided by the phagocytic count of normal serum.

The fact that at present phagocytosis is so little used in serodiagnostics largely depends on the difficulty in determining the difference between the phagocytosis in immune serum and in normal serum with sufficient accuracy (cf. Ove

Wulff).<sup>1)</sup> In the first place it is necessary to count the number of bacteria within each leucocyte with accuracy, and in the second place we must be able to evaluate whether the phagocytic count determined differs significantly from the normal count or we are only dealing with chance variation due for example to a faulty technique.

Through the procedure described by one of the authors (M. Jersild)<sup>2)</sup> for the phagocytic reaction, the normal opsonins are eliminated to a large degree. The figures found by this method are therefore almost solely indicative of the quantity of immune opsonin present, and in this manner the difficulty in comparing two phagocytic counts which lie very close has partly been removed.

Previously, when the degree of phagocytosis was to be determined, the bacteria contained in a certain number of leucocytes were counted and the average number of bacteria per leucocyte calculated. This is a laborious procedure, both tiring and time-consuming. In his phagocytosis reaction (used for bacteria of the *Brucella* group) Huddleson<sup>3)</sup> has simplified the procedure by using the following method:

The bacteria in 25 leucocytes are counted. The intensity of the phagocytosis is given by four figures, namely the number of leucocytes with a) 0 bacteria, b) 1–20, c) 21–40, and d)  $\geq 41$ ; the figures in group d are written furthest to the left, those of group a to the right and the groups c and b in between; the sum of the figures will always be 25, namely the number of leucocytes counted. With this grouping the leucocytes can be classified without detailed counts, which in routine work is a great advantage.

With some practice it is easy to decide from these four figures whether a certain reaction is strong or weak, but a more refined graduation cannot be obtained in this manner. If, however, it were possible, instead of using 4 figures, to

<sup>1)</sup> Wulff, O.: Studier over Fagocytose, Opsonin og Vaccinebehandling, Kobenhavn, 1911.

<sup>2)</sup> Jersild, M.: Acta Path. Mikrobiol. Scand. 18, 103, 1941.

<sup>3)</sup> Huddleson, I. F.: Brucellosis in Man and Animal. The Commonwealth Fund. N. Y., 1939.

Acta path. Vol. XX. 1.

state the degree of phagocytosis by one figure only, evaluation and comparison of different reactions would be easier.

In principle this would seem possible. If in one preparation the number of bacteria contained in each of all leucocytes were counted we would have obtained an observation of the distribution of the leucocytes with respect to phagocytic power. If this distribution were normal, it would be fully characterised by two figures, namely the mean and the standard deviation; the mean — indicating the average phagocytosis — should then be regarded as a measure of the intensity of phagocytosis, whilst the standard deviation would give a characteristic of the variation of the leucocytes. And if the distribution was not normal, it should all the same be possible to characterise it adequately by some other parameters which might then form the basis of our estimation.

2. In order to investigate the distribution detailed counts were made in 18 preparations, carefully selected in such a manner that practically all commonly occurring degrees of phagocytosis were represented. It was, however, not possible to count accurately the bacteria in leucocytes containing more than 40 Bacteria, but for our present aim an accuracy of  $\pm 5$  for leucocytes containing 40 to 60 bacteria was ample, and for leucocytes with still greater phagocytic power an accuracy of  $\pm 10$  sufficed.

A first glance at the observations (vide tables 1 a and b) gives the impression that the type of the distribution depends on the intensity of phagocytosis. When phagocytosis is intense (APc, nos. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) the distributions are fairly symmetrical with maximum frequency at the point of symmetry, whilst the distributions in the cases with weak phagocytosis (Nos. 1, 2, 3,  $F_2$ ,  $F_4$ ,  $F_6$ ,  $F_8$ , 16 a, 100, 98) are skew on account of the fixed lower limit 0. The two types of distribution have been illustrated in figs. 1 a and b. Phagocytosis was very weak in three out of the eighteen preparations (nos. 1, 2, 3), 60—70 per cent. of the leucocytes not showing phagocytosis. Since in these cases the type of distributions apparently deviates from the other types a reliable analysis would

49503

Table 1 a.

The distribution of 100 leucocytes with respect to absorbed bacteria.

	No. 1	No. 2	No. 3	F <sub>2</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>8</sub>	16a	100	98	APc	No. 4
0	64	62	69	53	47	46	52	31	24	14		
1				1	2	3	3	4	1			
2				4	5	4	4	5	6	3		
3	1	2	3	4	3	5	6	7	5	5		
4	5	4	9	4	6	5	3	7	5	3	2	
5	6	7	5	4	7	5	3	8	6	5	2	3
6	5	5	3	4	4	5	6	10	9	8	1	3
7	5	4	5	3	4	5	3	4	7	2		2
8	3	5	3	5	6	5	4	7	7	9	3	6
9	3	4	2	3	2	4	3	4	5	6	3	7
10	3	1		2	3	3	3	5	5	5	4	8
11	1	2	1	2	1	3	3	2	3	6	5	3
12	2	1		2	2	2	3	2	2	5	6	7
13		1		2	1	2	1	3	5	3	2	3
14	1			1	2		1	1	4	4	6	8
15				1	1		1		4	3	4	5
16				1	1	1	1		1	3	10	7
17					1	1				3	4	5
18				1	1				1	4	5	8
19	1	1		1	1					2	4	2
20										2	4	1
21		1				1				1	4	4
22				1						3	3	4
23											7	4
24											3	2
25											3	3
26											3	1
27											4	
28											3	
29											1	
30												
31												2
32				1							1	1
33												
34												
35											2	
36												
37											1	
38												
39											1	
40												
41												

Table 1 b.  
The distribution of 100 leucocytes with respect to absorbed bacteria.

	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9	No. 10
15	3	3	4		1	
20	5	13	22	1	1	1
25	3	19	19	2	1	4
30	13	15	19	11	6	4
35	9	14	13	11	5	7
40	5	14	12	7		
45	17	10	7	18	13	13
50	11	7	4	13	4	8
55	5	3		6	5	10
60	13	2		6	8	9
65	9			8	6	8
70	5			5	11	9
75	1			7	8	5
80	1			3	9	7
85				2	4	4
90					5	4
95					5	3
100					6	4
105					2	

require a far greater number of counts. Considering the small clinical interest presented by such weak preparations, we, however, refrained from this, and the following examination only deals with cases in which at least 50 per cent. of the leucocytes showed phagocytosis. The type of these distributions has been analysed by the so-called probit method, which is based on the following principle:

*If the distribution of the observations is normal, the relative number of observations not exceeding the mean by more than a certain multiple  $t$  of the standard deviation depends solely on  $t$ .* The dependence has been conveniently tabulated by C. I. Bliss; in order to avoid negative figures Bliss gives the values of  $t + 5$ , probits, corresponding to the percentages (vide Fisher & Yates: Statistical Tables, Table IX). In order to examine whether a distribution is normal we proceed as follows: For each number of bacteria it is

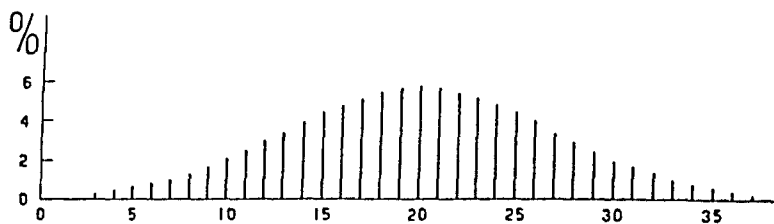


Fig. 1a.

Distribution of leucocytes in case of intense phagocytosis.

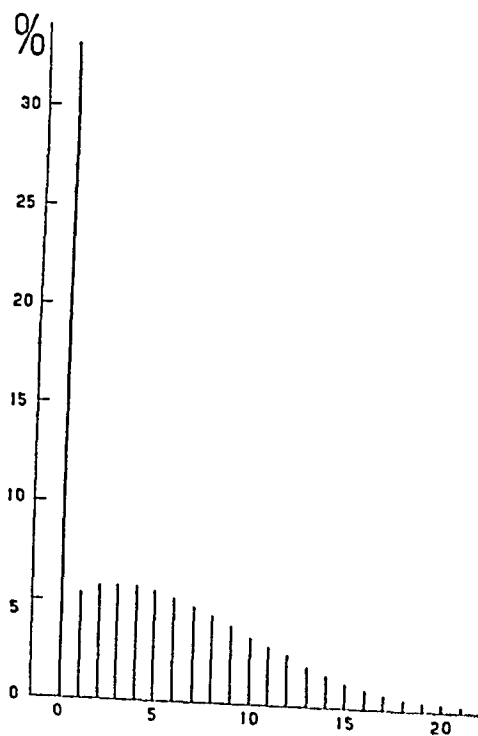


Fig. 1b.

Distribution of leucocytes in case of weak phagocytosis.

calculated how large a percentage of the leucocytes that have at most absorbed this number, and the probit corresponding to this percentage is found in Bliss's table. Then the probits are plotted against the number of bacteria, and if the distribution is normal the points will be grouped around a straight line. From the position and the slope of the straight

line we can obtain an estimate of the mean and the standard deviation of the distribution, the former estimate being the number of bacteria corresponding to the probit 5, and the latter estimate the reciprocal value of the slope.

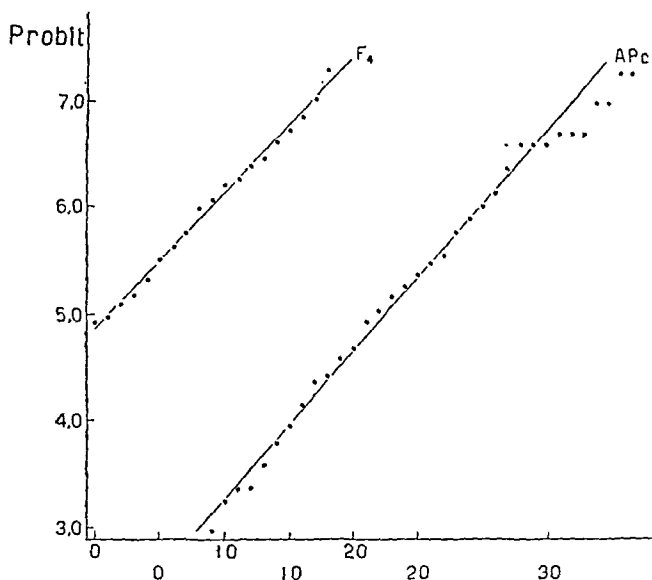


Fig. 2.  
Examples of probit diagrams.



Fig. 3.  
Distribution in respect of activity with threshold for phagocytosis.

In the preparations in which practically all leucocytes have shown phagocytosis we find that the points are really grouped around a straight line (cf. fig. 2, APc). In these cases we can therefore accept the hypothesis that the distribution is normal. In the weak preparations the distribution is necessarily skew — fewer than 0 bacteria in a leucocyte is an impossibility — but nevertheless we find that also in these preparations the points are grouped around a straight line

(cf. fig. 2,  $F_4$ ). As the distribution cannot possibly be normal, this fact at first glance seems paradoxical, but in reality it is quite natural. If we imagine that the leucocytes are normally distributed according to some sort of »activity«, and — for the sake of simplicity — that all bacteria behave alike towards the leucocytes, only such leucocytes as have an activity above a certain threshold will show phagocytosis, and phagocytosis becomes more intense the more the activity exceeds this threshold. The distribution is illustrated in fig. 3, and an ordinate has been drawn through the degree of activity which is necessary for phagocytosis. The shaded area represents the percentage of the leucocytes which have a weaker activity and therefore do not show phagocytosis, whilst the remaining curve shows the distribution with respect to activity of the leucocytes with phagocytosis, i. e. their distribution with respect to number of absorbed bacteria. Consequently, the leucocytes are normally distributed with respect to number of absorbed bacteria, except for an accumulation at 0, vide fig. 1 b. A probit curve of such a distribution has its starting point in 0 at the probit corresponding to the percentage of non-phagocytosing leucocytes and takes a straight course corresponding to the continuation of a normal distribution.

If the activity of almost all the leucocytes is larger than the »threshold« activity, the fraction without phagocytosis is so small that it is impossible to distinguish between a truncated and an ordinary normal distribution (cf. fig. 1 a).

The alternative assumption that all leucocytes are of the same activity, but the bacteria absorbable to varying degrees, leads to the same result in principle; and a combination of the two hypotheses will also lead to a truncated normal distribution.

3. As a truncated normal distribution is completely determined by the mean and the standard deviation of the normal distribution from which it is derived, it is a matter of course that these two figures are decisive for an evaluation of the degree of phagocytosis. The mean — in the above considerations: the average activity of the leucocytes — then indicates the strength of the preparation or »the degree of pha-



gocytosis», whilst the standard deviation — indicating the variability of the leucocytes — is of secondary importance in this connection. We now see that the phagocytic count previously used is inadequate in principle. In preparations in which the truncation of the distribution is not conspicuous, it does, however, give a good estimate of the mean, but in preparations in which several leucocytes are without phagocytosis, it becomes quite misleading. If we presume that detailed counts have been made, the probit method in such cases gives a serviceable estimate of the mean.

In routine work the problem, however, is: How is it possible to obtain a serviceable estimate of the mean when the distribution of 25 leucocytes is only characterised by the figures in the above mentioned 4 groups?

In theory the best possible estimate is obtained by R. A. Fisher's principle of maximum likelihood, but in our case this method is too laborious for routine work.

Foshay and Le Blanc<sup>1)</sup> have converted Huddleson's figures into one which they called the *phagocytic index*. They seem to have constructed this figure from biological considerations. »The maximum phagocytosis«, where all leucocytes have absorbed more than 40 bacteria, is given the figure 100, and »negative« phagocytosis, where no leucocytes have shown phagocytosis, the figure 0. They now reason as follows:

»A cell showing no inclusions, and by the same token a cell showing a large number of inclusions are both of greater biologic significance than cells showing moderate degrees of phagocytosis. Therefore we decided to weigh the extremes as against the two intermediate arrays.«

With this motive they introduce the following »phagocytic index«:

$$2d + c - b - 2a + 50$$

a, b, c, and d being the number of leucocytes in the said four groups. In a case with:

No of bacteria absorbed:	≥ 41	21—40	1—20	0
No of leucocytes:	10	10	5	0
	d	c	b	a

<sup>1)</sup> Foshay, L. & Le Blanc, T. J.: J. Lab. Clin. Med. 22, 1297, 1937.

the index will thus be:

$$20 + 10 - 5 - 0 + 50 = 75.$$

Foshay and Le Blanc continue: »This value is obviously an arbitrary one and implies that the two extremes are biologically twice as significant as the two arrays next to the point of origin. We do not know this to be true nor could we say that the extremes are of equal significance. But for the sake of simplicity it seemed advisable to use this arrangement.«

The index is arbitrary, it is true, but, as an alternative to the rather laborious correct method, we might examine whether it has a serviceable relation to the mean. Now it is clear that in such an arbitrary index both the parameters, the mean and the standard deviation, will enter in a manner which is highly complex. If the mean and the standard deviation vary much and independently from one preparation to another, the index will in one case be most influenced by one, in another case by the other, and most often not particularly by either of them. In the present experiments it

Table 2.  
Probit estimates of mean and standard deviation.

Exp.	Mean	Standard deviation
No. 1	}	more than 50 0's.
» 2		
» 3		
F 2	0	8
» 4	2	7
» 6	2	6
» 8	1	7
16 a	3	6
100	5	7
98	8	7
APc	17	7
No. 4	15	7
» 5	45	15
» 6	34	11
» 7	30	10
» 8	50	16
» 9	65	21
» 10	62	21

is, however, so fortunate that there exists a close relation between the mean and the standard deviation. This may be seen by a more detailed analysis of the 15 serviceable detailed counts. The probit diagrams of these preparations give us quite a good estimate of the mean and the standard deviation, also in the really truncated distributions. These

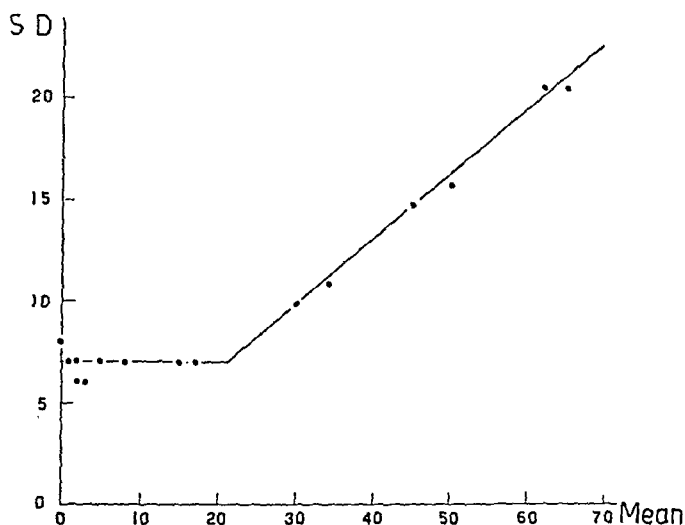


Fig. 4.

Relation between standard deviation and mean.

estimates have been entered in table 2, and in fig. 4 they have been plotted, the mean as abscissa, the standard deviation as ordinate. It is seen that there is a very close relationship between mean and standard deviation, and that roughly this relationship may be described as follows: with a mean below 21 the standard deviation is about 7, and above that mean the standard deviation is about  $\frac{1}{3}$  the mean. *But if the standard deviation depends on the mean, the index of Foshay and Le Blanc, as well as any other linear combination of the four frequencies in question will in the last instance depend on the mean only.*

Thus we find, that with such relationships as present in

these experiments it is possible from any linear »index« to form an estimate of the mean. But which index is the most suitable does not depend on whether the extremes of a distribution are more »biologically significant« than the central part, e. g. whether giants or dwarfs are more »biologically significant« than ordinary humans, but quite simply on the question *which combination of the four figures leads us to the best estimate of the mean, i. e. to the estimate with the smallest mean error.*

This problem has in fact been solved and it has, together with a series of allied problems, been treated in a separate mathematical paper, the main results of which are given below.

Table 3.  
Relation between mean and index.

Mean	Index		
$\xi$	$A_3$	$A_4$	$A'_4$
0	12.0	—5.63	—2.06
5	19.2	—4.24	—0.78
10	26.2	—3.10	0.51
15	35.2	—2.02	1.82
20	48.5	—0.64	3.03
25	61.0	0.70	4.11
15	35.2	—2.26	—0.97
20	48.5	—2.03	—0.47
25	61.0	—1.31	0.07
30	70.0	—0.02	0.87
35	77.5	1.66	1.91
40	83.5	3.22	3.34
45	87.8	4.46	4.65
50	91.0	5.37	5.81
55	93.0	6.01	6.73
60	94.8	6.48	7.44
70	96.5	7.04	8.38
80	97.5	7.35	8.91
90	98.2	7.52	9.24

4. The relation between the theoretical value of the index of Foshay and Le Blanc — here called  $A_3$  — and the true mean  $\xi$  has been tabulated in table 3 and plotted in fig. 5. The table or the figure directly gives the estimate,  $m_3$ , of the mean, corresponding to an observed index. If, for instance, the distribution 15, 7, 3, 0 has been observed, the index is

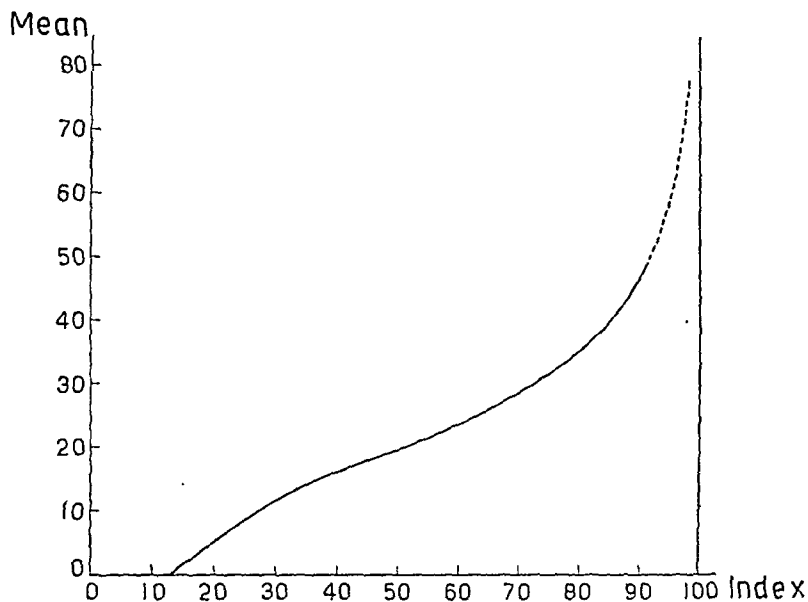


Fig. 5.

Relation between the mean and the index of Foshay and Le Blanc.

84 and the curve gives 40 as the corresponding estimate of the mean. The mean error,  $ME_3$ , of this estimate has for certain values of the true mean been entered in table 4 and a curve plotted in fig. 6, the ordinates of which are spaced on a logarithmic scale.

If the method of maximum likelihood had been used we would have obtained a smaller mean error, which has been entered in table 4 as  $ME_2$ . The accuracy lost when the index of Foshay and Le Blanc is used as a transitional calculation for obtaining the mean instead of the method of maximum likelihood is indicated by values of  $ME_3/ME_2$  (table 5). The

Table 4.

The mean errors of various estimates of the mean of a normal distribution by different groupings of the observations.

Mean	Mean errors					
$\xi$	ME <sub>1</sub>	ME <sub>2</sub>	ME <sub>3</sub>	ME <sub>4</sub>	ME' <sub>2</sub>	ME' <sub>4</sub>
0	1.57	1.74	1.75	1.75	1.70	1.70
5	1.45	1.79	1.81	1.81	1.66	1.66
10	1.41	1.91	1.99	1.91	1.66	1.66
15	1.40	1.82	1.87	1.83	1.67	1.67
20	1.40	1.72	1.74	1.73	1.78	1.78
25	1.51	1.95	2.34	2.10	1.86	2.08
15	1.40	1.82	1.87	1.97	1.67	2.43
20	1.40	1.72	1.74	1.85	1.78	1.89
25	1.51	1.95	2.34	2.00	1.86	1.92
30	1.81	2.16	2.72	2.17	2.03	2.06
35	2.11	2.60	3.20	2.60	2.33	2.39
40	2.41	3.29	4.01	3.29	2.75	2.76
45	2.71	4.24	5.15	4.26	3.33	3.35
50	3.02	5.43	6.66	5.50	4.08	4.13
55	3.32	6.98	8.61	7.06	5.03	5.11
60	3.62	8.83	10.94	8.95	6.19	6.33
70	4.22	13.51	17.25	13.75	9.19	9.49
80	4.83	19.78	26.31	20.25	13.23	13.72
90	5.43	27.70	37.84	29.59	18.38	19.80

ME<sub>1</sub>: Ungrouped observations from a truncated normal distribution. Maximum likelihood estimate.

ME<sub>2</sub>: Groups: 0, 1—20, 21—40,  $\geq 41$ . Maximum likelihood estimate.

ME<sub>3</sub>: Groups: 0, 1—20, 21—40,  $\geq 41$ . Index estimate.  
Coefficients:  $-2, -1, +1, +2$  for  $0 \leq \xi \leq 50$ .

ME<sub>4</sub>: Groups: 0, 1—20, 21—40,  $\geq 41$ . Index estimate.  
Coefficients:  $-8, -3, +2, +8$  for  $0 \leq \xi \leq 25$   
 $0, -3, -1, +8$  for  $15 \leq \xi \leq 50$ .

ME'<sub>2</sub>: Groups: 0, 1—15, 16—35, 36—50,  $\geq 51$ . Maximum likelihood estimate.

ME'<sub>4</sub>: Groups: 0, 1—15, 16—35, 36—50,  $\geq 51$ . Index estimate.  
Coefficients:  $-4, 0, +4, +10, +15$  for  $0 \leq \xi \leq 25$   
 $+2, -2, 0, +3, +10$  for  $15 \leq \xi \leq 62$ .

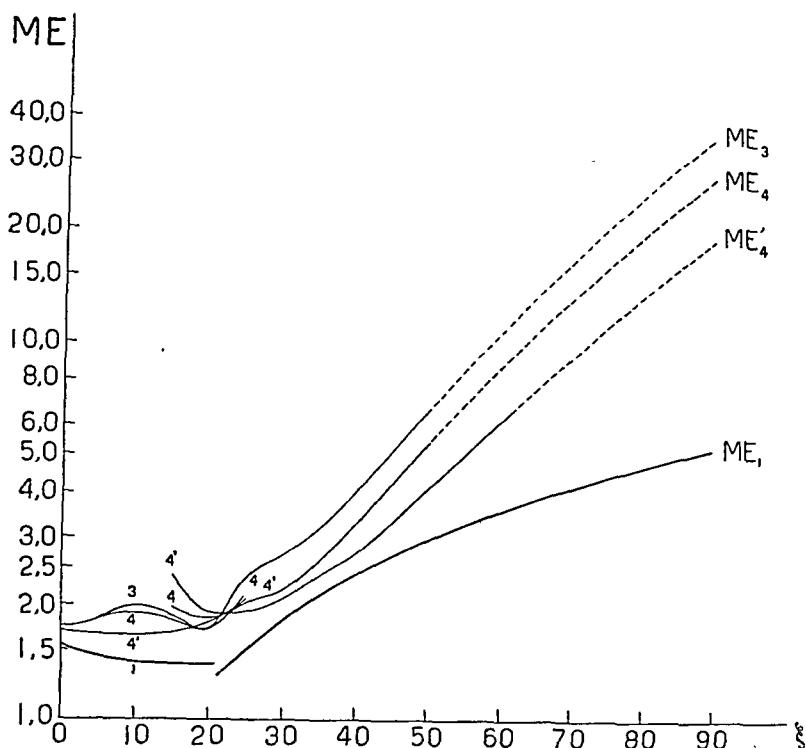


Fig. 6.

Mean errors of different estimates of the mean.

increase in mean error is 1—4 per cent. for means below 20 and on the average 22 per cent. for means between 20 and 50.

As mentioned above, it is far too tedious to use the method of maximum likelihood for routine analysis, and the question has therefore arisen whether it is possible to give a simpler method for calculating an estimate of the mean with a mean error of the same order of size as that of the maximum likelihood estimate.

The mathematical paper gives a procedure for constructing a linear index which leads to an estimate of the mean, the mean error of which is practically identical with  $ME_2$ .

Tabel. 5.

Comparison of the mean errors of different estimates of the mean.

$\bar{x}$	$\frac{ME_2}{ME_1}$	$\frac{ME_3}{ME_2}$	$\frac{ME_4}{ME_2}$	$\frac{ME_3}{ME_1}$	$\frac{ME_4}{ME_1}$	$\frac{ME'_2}{ME_1}$	$\frac{ME'_4}{ME'_2}$	$\frac{ME'_4}{ME_1}$
0	1.11	1.01	1.01	1.11	1.11	1.08	1.00	1.08
5	1.23	1.01	1.01	1.25	1.25	1.14	1.00	1.14
10	1.35	1.04	1.00	1.41	1.35	1.18	1.00	1.18
15	1.30	1.03	1.01	1.34	1.31	1.19	1.00	1.19
20	1.23	1.01	1.01	1.24	1.24	1.27	1.00	1.27
25	1.29	1.20	1.08	1.55	1.39	1.23	1.12	1.38
15	1.30	1.03	1.08	1.34	1.41	1.19	1.46	1.74
20	1.23	1.01	1.08	1.24	1.32	1.27	1.06	1.35
25	1.29	1.20	1.03	1.55	1.32	1.23	1.03	1.27
30	1.19	1.26	1.00	1.50	1.20	1.12	1.01	1.14
35	1.23	1.23	1.00	1.52	1.23	1.10	1.03	1.13
40	1.37	1.22	1.00	1.66	1.37	1.14	1.00	1.15
45	1.56	1.21	1.00	1.90	1.57	1.23	1.01	1.24
50	1.80	1.23	1.01	2.21	1.82	1.35	1.01	1.37
55	2.10	1.23	1.01	2.59	2.13	1.52	1.02	1.54
60	2.44	1.24	1.01	3.02	2.47	1.71	1.02	1.75
70	3.20	1.28	1.02	4.09	3.26	2.18	1.03	2.25
80	4.10	1.33	1.02	5.45	4.19	2.74	1.04	2.84
90	5.10	1.37	1.07	6.97	5.45	3.38	1.08	3.65

This linear index, which we have called  $A_4$ , is

$$8d + 2c - 3b - 8a \text{ for means below } 25,^*)$$

and

$$8d - c - 3b - 0a \text{ for means above } 15.$$

The relation between this index and the mean has been entered in table 3, and the mean error,  $ME_4$  of the corresponding estimate of the mean in table 4 and fig. 6. From the values of  $ME_4/ME_2$  in table 5 it is seen that  $ME_4$  is practically identical with  $ME_2$ .

In order to use the mean error in the usual way, the distribution of the mean must be practically normal. When the values of the mean are small, the leucocytes will generally be distributed over at least 3 groups and in such cases we may consider the distribution of the mean normal. When the true mean is above 50 the number of leucocytes in the

\*) For means between 15 and 25 any of the two expressions may be used (cf. Fig. 7).



group 20—40 will at most average 7. In the latter case it cannot be taken that the distribution of the mean is normal. The fact that the use of the index is limited to the interval 0 to 50 is indicated in fig. 6 by  $ME_3$  and  $ME_4$  being plotted with broken lines for means above 50.

5. In spite of the improvement of the index, the mean error is still comparatively big for large means, but now this is due only to the grouping. If the classes are made smaller, the mean error will decrease, and the least possible mean error is obtained if the observations are not grouped at all and the estimate of the mean is calculated according to the method of maximum likelihood. This mean error is called  $ME_1$  in table 4 and fig. 6. A comparison between  $ME_2$  and  $ME_1$  gives an impression of the loss in accuracy caused by Huddleson's grouping. The ratio of the latter two mean errors has been entered in table 5, and we see that with means below 40  $ME_2$  is on the average 25 per cent. greater than  $ME_1$ , whilst with larger means  $ME_2$  increases more and more in comparison with  $ME_1$ .

As it is indeed the fact that the groups are large that lends the greatest advantage to the routine work of analysis, the class limits can be narrowed but little. On the other hand, it is possible to increase the reliability of our estimate of large means by adding an extra limit above 40. In order to examine the effect of such a change the grouping: 0, 1—15, 16—35, 36—50,  $\geq 51$  has been analysed in the same manner as Huddleson's grouping.

The mean error  $ME'_2$  of the maximum likelihood estimate may be seen in table 4 and in table 5 the fraction  $ME'_2/ME_1$  has been entered. A comparison between  $ME'_2/ME_1$  and  $ME_2/ME_1$  shows that this new grouping is a considerable improvement on the previous one. For means below 40  $ME'_2$  is on the average 15 per cent.,  $ME_2$  25 per cent. larger than  $ME_1$ , the corresponding figures for the mean 50 being 35 and 80 per cent. respectively. The new grouping further yields the advantage of allowing means up to 62 to be included.



for, absolutely decides in which manner it is most economic to prepare the work. Which of these two procedures — or whether perhaps a third one — are opportune, of course depends on what the results are to be used for.

7. As the mean error depends on the true value of the mean we cannot in the present case determine the limits of the true mean in the usual manner by placing an interval of a suitable multiple of the mean error symmetrically on either side of the calculated mean. Instead we must determine, say, the 95 per cent. limits from the inequality

$$|m - \xi| \leq 2ME$$

from which follows that the lower limit is determined by the value of  $\xi$  found from the equation

$$\xi + 2ME = m$$

and the upper limit from

$$\xi - 2ME = m.$$

These limits may be determined graphically by first calculating  $\xi \pm 2ME$ , and then plotting the functions, using  $\xi \pm 2ME$  as abscissa and  $\xi$  as ordinate. The limits corresponding to  $m_1$ ,  $m_3$  and  $m_4$  have been plotted in fig. 7. This figure shows that with Huddleson's grouping it is impossible to determine the limits of the true mean by means of the suggested method when the observed mean exceeds 36. The new grouping, on the other hand, possesses the great advantage of allowing for values of the observed mean until 48, an advance which, of course, corresponds to the increase of 10 in the upper class limit.

8. To avoid every misunderstanding we wish to emphasise strongly that the whole of the above discussion is closely related to two premises, which have happened to be true in our experiments:

1) The distribution of the leucocytes with respect to absorbed bacteria is a truncated normal distribution.

2) The standard deviation of this distribution depends on the mean in a definite manner: it is constantly = 7 when the means are  $\leq 21$ , and above this it is  $1/3$  of the mean.

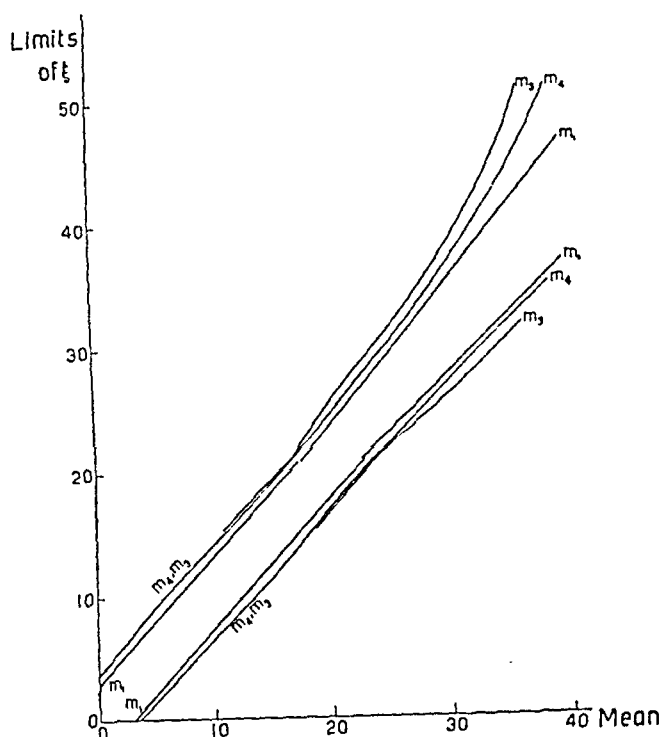


Fig. 7.

95% confidence limits of the mean calculated from the estimates of  $m_1$ ,  $m_2$  and  $m_3$ .

The fact that the distributions are truncated is presumably inherent to data of the present kind; but whether they are normal in other experiments with phagocytosis we cannot predict, the problem must necessarily be examined in each separate experimental series. And lastly we have nothing to support the presumption that the relation between mean and standard deviation should be reproduced in experiments in which the technique is not exactly the same as in the present experiments. If in another series of experiments the grouping of Huddleson or another grouping are wished for, then it is necessary in the same manner as in the present series, to make particular experiments in order to establish the rela-

lionship between mean and standard deviation with the technique in use, and then to make such tables as are necessary for an adequate calculation of the degree of phagocytosis — via the index of Foshay and Le Blanc or via some other linear index which might prove suitable.

Some readers may think the described procedure troublesome and laborious in comparison with the object of the experiment, but *it is the least work which can be given to the task if the great facility of using large groups is to be adhered to and the experimenter at the same time is to know the meaning of the results registered.*

It must be admitted that a simple statement of an index, as for example that of Foshay and Le Blanc, is very tempting, but the authors must strongly advise against it. *Without an analysis as the one outlined above it is impossible to know to what degree the index gives a characteristic of the intensity of phagocytosis.* In accordance with Foshay and Le Blanc to read an index of e. g. 46 as follows: »the patient's blood possessed 46 per cent. of his total capacity to phagocytose brucella« seems quite unjustified. A clear characteristic of the phagocytic intensity is only obtained when the exact relationship between the arbitrary index and the biologically relevant »mean of normal distribution of the leucocytes with respect to activity« has been mathematically specified.

### *Summary.*

The present paper is based on the technique presented by one of the authors (M. Jersild) for determining the degree of phagocytosis. It has been our aim to continue this work by developing an easy counting technique, sufficiently accurate for serodiagnostics.

The data on which the investigation is founded consist of a series of detailed counts from preparations covering all degrees of phagocytosis.

An analysis of the distribution of the leucocytes with respect to number of absorbed bacteria leads to a replacement of the previous inadequate definitions of »degree of phagocytosis« or »phagocytic count« by a more rational one.

It is further shown that a coarse grouping of the leucocytes according to the number of bacteria absorbed may yield an estimate of the degree of phagocytosis, which is almost as reliable as that based on detailed counts. In this case the grouping limits must be chosen in accordance with the fundamental properties of the distribution of the leucocytes. Thus, it is demonstrated that the limits 0, 20, 40, suggested by Huddleson lead to a much poorer result than the limits 0, 15, 35, 50, which latter limits are just as easily applied in practice.

Finally it is pointed out that the computation of the best possible estimate of the degree of phagocytosis is much too cumbersome for routine work; but for practical purposes it may be replaced by an estimate obtained from a simple linear combination of the counts. Here again it is, however, of importance that this linear combination is not chosen arbitrarily.

It has been possible to state the best possible linear combination, i. e. that which yields the most reliable estimate of the degree of phagocytosis. And when compared with the »phagocytic index« of Foshay and La Blanc this linear combination proves to be considerably better.

In conclusion we maintain that coarse grouping is quite often a great help in routine work, but that it pays to devote time to the work necessary for elaborating suitable grouping limits and an adequate method for utilising the results.

---

The above work demanded extensive calculations which were made possible by a grant from the Carlsberg Foundation, for which the authors wish to express their sincere thanks.

## EXPERIMENTELLE BEITRÄGE ZUR OLIGODYNAMISCHEN WIRKUNG MIT BESONDERER RÜCKSICHT AUF DIE WASSERREINIGUNG. (I)

Von Dr. med. *Otto Ornstein*.

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. April 1942).

In einer kürzlich in dieser Zeitschrift erfolgten Mitteilung (12) habe ich über die Beziehung der Wasserstoffionenkonzentration zur Desinfektionswirkung der Halogene berichtet. Darnach werden diese in saurem Milieu stärker wirksam als in alkalischem u. zw., unter Zunahme der relativen Wirkung, innerhalb der gewählten pH-Grenzen, mit zunehmendem Molekulargewicht. Annähernd physiologische Besatzung der fallenden Halogenreihen entsprechend n/10 Kochsalzlösung bewirkt eine Abschwächung in umgekehrter Reihenfolge.

In der gleichen Arbeit konnte ich alte, nicht publizierte Versuche über die Wirkung der Halogenide der Alkali — und Erdalkalireihe sowie einiger Schwermetallsalze im wesentlichen bestätigen, erweitern und feststellen, dass die Aktivitätskurven der Natriumsalze des Fluor, Brom und Jod nach der sauren Seite der pH, des Natriumchlorid dagegen nach der alkalischen gerichtet sind dass ferner Goldchlorid und Quecksilberchlorid in saurem, die Salze des Kupfers und Silbers, soweit sie geprüft wurden ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ), in alkalischem Mittel einem Optimum zustreben, ohne allerdings meistens die reine Wirkung in Wasser zu erreichen.

Anmerkwert sind die sowohl bei den Halogenen und Halogeniden als auch bei den Schwermetallen und besonders bei organischen Verbindungen der Pyridin-, Chinolin- und Acridinreihe in deren wässrigen und gepufferten Lösungen auftretenden oligodynamischen Wirkungszonen, welche in ausserordentlich hohen Verdünnungen der betreffenden Stoffe in Erscheinung treten.

Diese bald engeren bald weiteren Wirkungszonen sind von ausserordentlich kleinen Mengen anderer u. U. an und für sich praktisch indifferenten Stoffe abhängig, so dass scheinbar unwesentliche Änderungen des Milieus darüber entscheiden, ob es zu einer durchgreifenden Keimabtötung kommt oder nicht. Dabei spielen Neutralsalze eine nicht minder bedeutsame Rolle als die sogenannten Desinfektionsmittel selbst, nicht zuletzt aber der Grad der Ionisation, in welchem sich beide unter der aktuellen Reaktion des gegebenen Systems befinden.

Es ist oben von oligodynamischen Wirkungen die Rede gewesen und deshalb vielleicht angebracht, über die zugrunde liegenden Beobachtungen und deren Erklärung sich Rechenschaft abzulegen. Von Naegelis Untersuchungen über die oligodynamischen Erscheinungen an lebenden Zellen (1) sind in gleicher Vielseitigkeit der Fragestellung später kaum mehr in Angriff genommen worden. Das lag nicht nur an dem morphologisch reicheren Objekte, welches ihm für seine Untersuchungen diente, den *Spirogyren*, sondern an den Um- und Irrwegen, welche er als Entdecker zu gehen gezwungen war und von welchen er mit zäher Ausdauer auf den rechten Weg gelangte. Von Naegelis Untersuchungen gingen davon aus, dass destilliertes Wasser und auch Brunnenwasser (Leitungswasser) »für das Plasma der gesunden Zellen unter gewissen Bedingungen todbringend (ist), während das sogenannte unreine Wasser, nämlich Fluss-, See- und Sumpfwasser diese Wirkung nie hat. Die Untersuchungen wurden mit Süßwasseralgen angestellt, also mit Zellen, die an das Wasser gewöhnt sind.«

Von Neageli hat den analytischen Nachweis der Metalle in vergifteten Wasser erbracht. Er hat die Bedeutung des Sauerstoffs und der Kohlensäure als Voraussetzung der Lösung des Metalls klar erkannt. Er hat die am Glase haftende Nachwirkung des Metalls entdeckt; die Bedeutung der Kohlensäure dabei, sowie die Beziehung zwischen Konzentration der Metalllösung und benetzter Oberfläche des Behälters z. B.



von Gläsern, schliesslich die Erschöpfung der oligodynamischen Wirkung in Metalllösungen durch zahlreiche, vorwiegend organische Stoffe (Schwefel, Kohlenstoff, Superoxyde, Coaks, Steinkohle, Torf, Stärke, Cellulose, Seide, Wolle, Federn, Gummi, Dextrin, Eiweiss, Leim und schliesslich die Algenzellen selbst in grösserer Menge) festgestellt. Die morphologische Analyse der Veränderungen des Plasmanschlauchs, der Chlorophyllbänder, der Saftströmung und des Zellkerns bei den vergifteten Algen bildete die Grundlage seiner Anschauung von den verschiedenen Vergiftungsarten. Diese hat von Naegeli dann durch wichtige physiologische Beobachtungen über das Alter und den Vegetationszustand der Algen als Voraussetzung ihrer Vergiftung stützen können und endlich die Grenzwerte zahlreicher Metallverbindungen bestimmt, welche einer spezifisch-giftigen, einer oligodynamischen Wirkung oder dem natürlichen Absterben entsprechen. Es sind also biologische Gesichtspunkte, welche von Naegelis Stellungnahme zu der von ihm entdeckten oligodynamischen Wirkung begründen.

Die von späteren Untersuchern vorgenommenen Nachprüfungen bestätigten den oligodynamischen Effekt auch im Bereiche der die menschliche Pathologie angehenden Krankheitserreger, wollten allerdings einen wesentlichen Unterschied zwischen chemisch-giftiger und oligodynamischer Wirkung nicht anerkennen (2,3). Diese Frage ist auch weiterhin nicht befriedigend geklärt worden. Dagegen sind der Frage des Lösungsvorganges an den Metallen bzw. der Mitwirkung der lebenden Zellen selbst eine grosse Reihe von Arbeiten gewidmet worden. Diese haben die Beobachtungen von Naegelis im wesentlichen bestätigt und in physikalisch-chemischer Hinsicht erweitert.

Nur zwei Autoren haben das Phaenomen der Nachwirkung des Kupfers vom Glase einer Untersuchung unterzogen: Martin Ficker (3), der das Ablösungsprodukt mit der Wirkung frischer Kupferlösung in Vergleich setzte, und von Linden (4), welche Untersuchungen über die Aufnahme von Kupfer in Glaspulver anstellen liess und dabei die Bildung von

Kupfersilikaten feststellte. Ficker hat auch noch ein anderes Problem gestreift, nämlich die Glaswirkung selbst, welche einen schützenden Effekt gegen die Oligodynamie bei Cholera-vibrionen ausüben sollte.

Er beruft sich dafür auf die Alkaliabspaltung aus gewöhnlichen Glase durch Wasser nach Mylius und Foerster (5). In  $\text{Na}_2\text{O}$ -äquivalenten ausgedrückt gingen nach den Untersuchungen dieser Autoren in 24 Stunden bei  $20^\circ$  Celsius von  $100\text{ cm}^2$  Glasoberfläche je nach der Glasart  $0.005\text{--}0.435\text{ mg Na}_2\text{O}$  (etwa  $n/600000\text{--}n/7000$ ), in einer Stunde bei  $80^\circ$  sogar zwischen  $0.018\text{--}1.213\text{ mg Na}_2\text{O}$  (etwa  $n/170000\text{--}n/2500$ ) in  $100\text{ cm}^3$  Wasser in Lösung. Ficker fand erst regelmässige und vergleichbare oligodynamische Effekte, wenn er Destillate aus schwer angreifbarem z. B. Jenaer Glase verwendete. So erhaltene Destillate hatten an sich einen überaus gleichmässigen und hohen bakteriziden Effekt. Auf den Einfluss des Glases auf den Entkeimungsprozess komme ich noch mehrfach in dieser Darstellung zurück.

Voraussetzung für ein tieferes Eindringen in den Wirkungsmechanismus der Oligodynamie waren die neueren physikalisch-chemischen Arbeiten über die Komplexbildung. Diese erst bilden den Ausgangspunkt für das Verständnis der Lösungsverhältnisse der Metalle im Wasser und der Aufnahme der Metallverbindungen in die Zelle.

In einer Mitteilung zur Kenntnis der Konstitution von Salzlösungen hat R. Abegg (6) über Versuche berichtet, nach dem Vorgange von Nernst aus dem Potential einer Metallelektrode gegen die Lösung eines Salzes dieses Metalls die Konzentration der einfachen Metallionen zu ermitteln. Das Salz  $\text{CdCl}_2$  enthält z. B. (Hittorf) ausser den einfachen Ionen  $\text{Cd}'$  und  $\text{Cl}'$  noch in erheblicher Menge komplexe Cd-haltige Anionen von der allgemeinen Formel  $(\text{CdCl}_2)_n(\text{Cl}')_m$ . Diese Befunde an Schwermetallsalzen bestätigte Arrhenius in seinen Gefrierpunktmessungen (1888). Abegg und Bodländer haben auf solche Komplexbildung als charakteristisch für die Doppelsalze hingewiesen und daraus das Vorhandensein komplexer Ionen auch in den Lösungen einfacher Salze erschlossen (1899).

Komplexbildung besteht in der Anlagerung undissoziierter Molekeln des Elektrolyten an eine seiner Ionenarten und ist in ihrem Betrage von der Konzentration der beiden Komponenten (Ion und Undissoziiertes) abhängig. Die chemische Natur der Elemente steht in einem bestimmten Verhältnisse zu deren Ionenbildungstendenz (7). Zusatz von Salzen gleichen Anions lässt die Komplexbildung noch zunehmen. Bei Verdünnung solcher durch gleichionigen Zusatz stark komplexer Lösungen kann die Bildung einfacher Metallionen so stark zunehmen, dass die verdünnteren Lösungen an solchen konzentrierter werden können.

In einer Arbeit über komplexe Kupferverbindungen berichtet V. Kohlschütter (8) über Kupferammoniakverbindungen, wobei aus konzentrierter  $\text{CuCl}_2$ -Lösung durch Ammoniak zunächst  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$  ausfällt, in überschüssigem Ammoniak sich aber wieder löst unter Bildung des komplexen Kations  $(\text{Cu}(\text{NH}_3)_4)^{++}$ , weiterhin über Selbstkomplexbildung bei der Elektrolyse von Kupferchlorid in salzsaurer Lösung oder in der Lösung von Alkali- und Erdalkalichloriden. Auch bei verdünnteren Salzlösungen ist solche Selbstkomplexbildung zu beobachten.

K. Spiro hat darzulegen versucht, »wieweit die Unterscheidung von oligodynamischer und spezifischer (d. h. spezifischgiftiger im Sinne von Naegelis) Wirkung der Kupfersalze durch chemisch-physikalische Vorgänge im Sinne der erst seit Naegeli gewonnenen Anschauungen und Vorstellungen erläutert werden kann.«

Kupferphosphat und karbonat sind in Eiweiss löslich. Von besonderer Bedeutung für die Speicherung von Kupfer in der Zelle sind Ammoniak, Aminosäuren, Peptone, Eiweisskörper und Lipotide. Sorgt man nun dafür, dass die durch Oxydation metallischen Kupfers entstehenden Cuprisalze auch eine Bindungsmöglichkeit mit den genannten Substanzen oder mit Zellen finden, so wird das Gleichgewicht in der Lösung sofort gestört, und werden immer neue Mengen Kupfer gelöst und wieder gebunden. Dabei erfolgt die Aufnahme des Kupfers aus geringen Kupferkonzentrationen durch kupferbindende Substanzen in grösseren Mengen und bei stärkerer Wirkung als aus konzentrierteren Lösungen, entspricht also einer Adsorptionskurve. In dem kompliziert aufgebauten, heterogenen System der Zelle reagieren die verschiedenen Substanzen mit verschiedener Affinität sowohl physikalischer (Adsorption) als auch chemischer Natur für Kupfer und daher in qualitativ und quantitativ verschiedener Weise, jenachdem wir viel oder wenig Kupfer anwenden (9).

Anlässlich einer Beobachtung Bullots im Laboratorium J. Loeb's, dass kupferhaltiges Wasser durch kleine Kochsalzmengen für *Gammarus* weitgehend entgiftet werden konnte, hat Spiro (10) die Frage gestellt, ob es sich dabei um einen echten, ionalen Antagonismus handele, bei welchem die beiden Antagonisten dadurch aus der Lösung ausscheiden, dass sie beide eine unlösliche oder eine nicht ionisierte, lösliche Verbindung eingehen.

Solche Komplexsalzbildungen entstehen z. B. durch den Antagonismus von Quecksilberchlorid und Kochsalz, von Kupfersulfat und Natriumthiosulfat. Spiro konnte die Frage bejahen. Die Hemmung oder Förderung der oligodynamischen Wirkung des Kupfers beruht nämlich auf den mit dem Natrium verbundenen Anionen. Nach Spiros Untersuchungen nimmt das Reduktionsvermögen der geprüften Anionen für Kupfer entsprechend der lyotropen Reihe Hofmeisters (Rhodan > Jod > Cyan > Nitrat > Chlor > Sulfat > Acetat) zu: Rhodan-, Jod-, Cyanionen reduzieren Cupri- zu Cuprosalzen, die Halogenide bilden mit Kupfersalzen unter Hydrolyse leicht Oxyhalogenide, Sulfit und Thiosulfat leicht lösliche komplexe Salze. Durch die Überführung der Cupri- in Cuproionen wird aber die Kupferwirkung wesentlich herabgesetzt.

Das Wesen der oligodynamischen Wirkung besteht in der Lösung metallischen Kupfers zu Cupriionen, was durch die Oxydation natriumjodidhaltiger Guajaklösung (Pagenstechersche Reaktion) angezeigt wird. Über die Cupriionenwirkung hinaus muss man nach Spiro aber auch an die Veränderung des Quellungsvermögens der Eiweisskörper und des Protoplasmas durch Salze und die dadurch veränderte Aufnahme der Zellen für Kupfersalze denken, schliesslich an eine durch verschiedene Anionen bewirkte Adsorptionsänderung.

Auf dem problemreichen Gebiete der Oligodynamie sind also noch viele Fragen offen. Hailer sagt bei der Erörterung der Beziehungen zwischen Konzentration und keimtötender Wirkung: »Zwischen Indifferenz der Wirkung und Wachstumsbegünstigung schiebt sich nun bei manchen Stoffen in gewissen sehr niedrigen Konzentrationen eine Hemmungs- und Abtötungszone ein. Diese Erscheinung ist namentlich von Nac-

geli an Süßwasseralgen, vor allem an Spirogyren und mit Kupfer..... studiert und ..... als oligodynamisch bezeichnet worden. Das Vergiftungsbild ist dabei ein anderes als bei höheren Konzentrationen..... Welche Stoffe und welche Konzentrationen von diesen Stoffen das Wachstum begünstigen, oligodynamisch wirken oder einflusslos bleiben, ist noch nicht systematisch geprüft worden« (11). Diese Formulierung des Problems der oligodynamischen Wirkung wird dem biologischen Gedankengange von Naegelis gerecht und kann als Programm der vorliegenden Untersuchung gelten.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung bin ich gerne einer Anregung Herrn Professor Naeslunds gefolgt, der Prüfung oligodynamischer Wirkungen im Bereiche der heute geübten Wassereinigung und Wasserversorgung nachzugehen. Bei der Weitläufigkeit der Aufgabe konnte es sich zunächst nur darum handeln, einige orientierende Versuche in dem problemreichen Gebiete darüber vorzunehmen, ob die angewandte Methodik praktisch brauchbare Aufschlüsse erwarten lässt. Dabei war sowohl auf die Zusammensetzung des Rohwassers als auch auf den Wasserreinigungsprozess selbst in seinen verschiedenen Phasen, d. h. auf die Zusätze (Aluminiumsulfat, Calciumoxyd, Soda, Chlor u. a.), sowie auf das Wasserleitungssystem in seinen verschiedenen Abschnitten Rücksicht zu nehmen. Im Besonderen waren die Neutralsalze des Wassers, die Alkali- und Erdalkalichloride, -nitrate, -sulfate, weiterhin die Karbonate, Eisen, Mangan u. a. m., überdies die Wasserstoffionenkonzentration zu berücksichtigen, auf die Zusätze im eigentlichen Reinigungsprozess einzugehen und die Stoffe der Wasserbehälter und -leitungen in ihrem Einflusse auf oligodynamische Wirkungen im Bereiche derzeitiger Wasserversorgung zu analysieren.

### *Allgemeine Anmerkung zur Technik der Versuche und zur Lesung der Tabellen.*

Bei der Anstellung der im folgenden dargestellten Versuche habe ich mich wie bisher ausschliesslich des Suspensions-

versuchs bedient. Die ausgedehnten Reihenversuche, welche bei dem Zwecke der Untersuchung erforderlich wurden, verboten schon rein technisch die Anwendung von Keimträgern. Im übrigen bot hier die Auszählung bzw. Schätzung meistens hinreichende Genauigkeit für die Beurteilung der Ergebnisse. Die Gefahr einer störenden Übertragung von Desinfektionsmitteln bei der Einsaat konnte praktisch als belanglos angesehen werden; handelte es sich doch vor allem um die Feststellung der Wirkungsbereiche von Desinfektionsmitteln und deren Kombinationen, welche jenseits der durch Komplexbildung indifferenten Zone liegen. Bei dieser zweiten Wirkungszone handelt es sich aber meistens um so geringe Konzentrationen auch stark wirkender Mittel, dass mit der Übertragung entwicklungshemmender Mengen des Desinficiens bei der Überimpfung auf Nährböden nicht mehr gerechnet zu werden braucht. Durch wiederholte Aussaaten nach bestimmten Zeiten konnten so auch zuverlässige Endwerte gewonnen werden, welche nicht nur der methodischen Erfassung des Wirkungsmechanismus dienlich sind, sondern auch praktisch verwertbare Anhaltspunkte bieten.

Die in den Versuchen angegebenen Normallösungswerte entsprechen der Konzentration der in den Versuchen jeweils zur Verwendung gekommenen chemischen Körper. Als Puffer kamen ausschliesslich Phosphatpuffer nach Soerensen zur Anwendung u. zw., wo nicht besonders angegeben, in  $m/60$  Lösung. In den Tabellen sind deshalb meistens nur die nackten pH-Zahlen angegeben z. B. 5.3, 5.9, 6.6, 7.3, 8.0. Die einzelnen Röhrchen der Versuchsreihen enthielten durchweg  $2\text{ cm}^3$  Gesamtflüssigkeit einschl. der Bakteriensuspension.

Die Zahlen, Striche und Kreuze in den Tabellen bedeuten: 4: etwa der Einsaat entsprechendes Wachstum, 3: etwa  $\frac{3}{4}$ , 2: etwa  $\frac{2}{4}$ , 1: etwa  $\frac{1}{4}$  der Einsaat,  $\pm$ :  $\frac{1}{8}$ ,  $\pm$ :  $\frac{1}{16}$  und weniger, —: kein Wachstum oder 20 (durchschnittlich weniger als  $\frac{1}{1000}$  der Einsaat) und weniger ausgewachsene Kolonien. In einigen Versuchen sind diese resistenten Keime angegeben. Nur frisch in Jenaer Glas destilliertes Wasser kam zur Anwendung. Das Glasgerät wurde nach jedem Versuche in

Chromschwefelsäure gereinigt, gespült und getrocknet, auch gleich verwendet. Leider stand einheitliches, schwer angreifbares Glas nicht zur Verfügung.

# I. Versuche über die Kombination von Jod und Kupfer, sowie von Jod, Kupfer und Kochsalz.

Zunächst wurden fallende Mengen von Jod in wässriger Lösung mit fallenden Mengen von Kupferchlorid ( $\text{CuCl}_2$ ) kombiniert, um in die quantitativen Verhältnisse der Kupfer- bzw. der Jodwirkung im Vergleiche mit deren Kombination Einblick zu gewinnen.

Für diese Versuche verweise ich auf *Tabelle 38*, welche besonders anschaulich zeigt, dass Kombinationen des Metallsalzes mit

## Versuch 38.

Grenzwertbestimmung einer Kombination von Kupferchlorid und Jodwasser in doppelt destilliertem Wasser [gegen  $\frac{1}{10}$  Öse Staphylokokken]. Aussaat nach 24 Stunden:

J <sub>2</sub> :	$\frac{n}{10000}$	$\frac{n}{33333}$	$\frac{n}{100000}$	$\frac{n}{333333}$	$\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{3,3 \text{ Mill.}}$	$\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	aq.	
aq.	—	—	—(1)	3	3	—	4	4	
CuCl <sub>2</sub> $\frac{n}{10000}$	—	—	—	—	—	—	—	—	6,7 mg/l
„ $\frac{n}{33333}$	—	—	—	—	—	—	—	—	
„ $\frac{n}{100000}$	—	—	—	±	—	±(33)	—	—	0,67 „
„ $\frac{n}{333333}$	—	—	—(16)	2	3	3	2	±	
„ $\frac{n}{1000000}$	—	—	±	4	3	3	3	±	0,067 „
„ $\frac{n}{3333333}$	—	—	±	3	—	3	3	3	
„ $\frac{n}{10000000}$	—	—	±	4	3	—	3	3	0,0067 „
J <sub>2</sub> : mg/L	12.7		1.27		0.127		0.0127		

Wegen der Technik der Versuche (Suspensionsversuche) und der Versuchsdarstellung verweise ich auf den Schluss der Einleitung.

Jod in wässriger Lösung beträchtlich schwächer zu wirken scheinen als die Jod- bzw. die Kupferreihen allein. Die Jodwasser- und die Kupferchloridkontrollen wirken noch absolut keimtötend bis zur Verdünnung  $n/100000$  (entspr. 1.27 mg/l J, bzw. 0.32 mg/l Cu), Kupfer auch noch stark keimvermindernd bis  $n/1000000$  (0.032 mg/l Cu) in 24 Stunden, während die zwischen diesen Werten liegenden, variierten Kombinationen fast gar keine Keimabnahme aufweisen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass etwa bei  $n/1000000$ — $n/10000000$  der Kombination Jod-Kupferchlorid eine mehr oder weniger scharf begrenzte Wirkungszone erscheint, welche oft auch in der Jodreihe als »oligodynamische« Zone auftritt und auch bei der Kupferchloridreihe in den höheren Verdünnungen, u. U. noch über die angegebenen Grenzen hinaus angedeutet ist. Versuch 38 ist wie die bisherigen Versuche (siehe die vorige Mitteilung in dieser Zeitschrift) mit einem sehr resistenten Staphylokokkenstamme durchgeführt.

Ein grundsätzlich ähnliches Verhalten zeigt die Kombination gegen Sporen. In *Versuch 45* ist Jod in fallenden Mengen im Vergleich mit Jod und Kupferchlorid in fallenden Mengen gegen Subtilissporen geprüft. Hier tritt entsprechend dem resistenteren Testobjekt einerseits schon die absolute Wirkung des Jod etwas, wenn auch nicht wesentlich, hinter der auf Staphylokokken zurück; anderseits ist hier das Kupfer im Vergleich mit der Kontrolle in destilliertem Wasser geradezu von hemmender Wirkung auf den Abtötungsprozess in den gewählten Konzentrationen, und nähert sich erst in den höheren Verdünnungen u. zw. in Kombination mit Jod der reinen Jodwirkung.

Auf die quantitativen Verhältnisse der Kombination von Kupfer mit Halogenen bei der Desinfektionswirkung gegen Subtilissporen komme ich anlässlich der Chlorkupferversuchen in destilliertem (Versuch 50), sowie in Gegenwart von Puffern bzw. in Leitungswasser (Versuch 68), unter nochmaliger Bezugnahme auf Versuch 45 eingehend zurück.

In den nun folgenden Versuchen wurde der Einfluss variierten Wasserstoffionenkonzentration auf die Desinfektionswirkung der Kombination Jod-Kupferchlorid untersucht, ferner der Einfluss des Zusatzes von Kochsalz bis zu  $n/10$  Konzentration; weiterhin die Wirkung von Jod-Kupferchlorid in Leitungswasser (Versuch 48). Entsprechend den in Versuch 38 verzeichneten Grenzwerten des



## Versuch 45.

Jod mit Pufferlösungen in pH-Grenzwerten gegen Subtilis-Sporen,  
desgl. kombiniert mit verschiedenen Konzentrationen von  
Kupferchlorid:

mg/l J <sub>2</sub> :	12,7 $\frac{n}{10000}$	$\frac{n}{33333}$	1.27 $\frac{n}{100000}$	$\frac{n}{333333}$	0.127 $\frac{n}{1000000}$	aq.	CuCl <sub>2</sub> : mg/l
aq.	—	—	12	21	12	16	
pH 5.3	—	—	34	1—200	1—200	55	
pH 8.0	100	50—100	56	63	66	> 200	
CuCl <sub>2</sub> $\frac{n}{10000}$	—	—	31	28	29	44	6.7 mg/l
CuCl <sub>2</sub> pH 5.3	—	—	1—200	26	7	14	
CuCl <sub>2</sub> pH 8.0	4	50	> 40	40	45	39	
CuCl <sub>2</sub> $\frac{n}{33333}$	—	—	45	77	> 200	> 200	2.2 mg/l
CuCl <sub>2</sub> pH 5.3	—	—	> 200	41	32	49	
CuCl <sub>2</sub> pH 8.0	17	50	59	64	82	48	
CuCl <sub>2</sub> $\frac{n}{100000}$	(—	—	42	32	48	65 n. 24 Stdn.)	
CuCl <sub>2</sub> pH 5.3	—	—	15	14	14	10	0.67 mg/l
CuCl <sub>2</sub> pH 8.0	5	12	17	7	26	12	

Einsaat  $\frac{1}{10}$  Öse Sporen, Aussaat nach 48 Stunden etwa  $\frac{1}{500}$ — $\frac{1}{1000}$  der Einsaat. Die ausgewachsenen Kolonien sind ausgezählt. Der Wirkungsgrad von Jod in Wasser sowie in saurer Phosphatlösung gegen Subtilis-Sporen entspricht ungefähr dem gegen Staphylococcus aureus. Dagegen tritt die bei pH 8 so auffällige, additive Kupferwirkung gegen Staphylokokken hier nur in einer relativen Keimverminderung zutage, welche bei den höheren Kupferverdünnungen zu besonders starker Keimabnahme führt.

In Modellversuchen variiert pH wurden ausschliesslich *Phosphatpuffer* verwendet.

Kupfers, welche allein noch eine überaus starke Keimverminderung in 24 Stunden bewirkten, von Jod in dessen höheren Verdünnungen aber nahezu vollständig gehemmt wurden, sind diese Versuche ohne weitere Variation für Kupferchlorid nur mit dem Werte  $n/1000000$  angesetzt.

Wie aus *Versuch 42* ersichtlich ist, entsprechen die Grenzwerte von Jod und Kupferchlorid gegen Staphylokokken im wesentlichen den in Versuch 38 verzeichneten. Den Jodkontrollen im ersten horizontalen Stabe sind zwei vertikale Stäbe, links für die Pufferkontrollen, rechts für die Kupferchloridkontrollen angeschlossen, dazwischen sind die Kombinationen Jod-Kupfer der verschiedenen pH-Bereiche eingereiht; wegen der entsprechenden Jodkontrollen verweise ich auf Versuch 35 meiner vorigen Mitteilung (12).

*Versuch 42.*

Kombination von Jod und Kupferchlorid bei variiertem pH, Ansatz wie bisher, Aussaat nach 48 Stunden:

mg/l J <sub>2</sub> :		12.7 $\frac{n}{10000}$	$\frac{n}{33333}$	1.27 $\frac{n}{100000}$	$\frac{n}{333333}$	0.127 $\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{3 \text{ Mill.}}$	0.0127 $\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	CuCl <sub>2</sub> Kontrolle $\frac{n}{\text{Mill.}}$ (0.067 mg/l)
aq.	2	—	—	2	4	—	2	2	—
5.3	2	—	—	3	3	—	2	2	2
5.9	3	—	—	3	4	1	4	3	2
6.6	4	—	±	4	4	2	4	4	2
7.3	4	—	3	3	4	3	3	—	—
8.0	4	—	2	2	—	1	3	2	±
$\frac{n}{10}$ NaCl	4	—	—	3	4	1	4	4	3
5.3	3	—	—	3	3	±	3	3	3
5.9	4	—	—	3	3	1	3	3	3
6.6	4	—	—	3	3	1	4	3	2
7.3	4	—	±	2	2	1	4	3	2
8.0	2	—	±	—	1	—	2	2	1

Zu beachten ist auch die bei pH: 7.3 unter  $n/10.000.000$  Chlor auftretende, absolute Wirkungszone. Im wesentlichen das gleiche Bild, nur schärfer akzentuiert in dem vertikalen Stabe starker, relativer Keimverminderung bei  $n/1000000$  Jod und in einer horizontalen Wiederholung von Zonen absoluter Keimtötung in dem für die Kupferwirkung günstigen alkalischen pH-Bereiche- also eine wesentliche Verstärkung ergibt die Kombination Jod-Kupfer-Kochsalz, trotz an sich stärkerer Hemmung von Jod wie Kupfer durch Kochsalz in den Kontrollen.

Noch eindrucksvoller tritt diese Verstärkung der Kombination Jod-Kupfer in *Versuch 43* hervor, welcher die eben beschriebenen Verhältnisse (statt nach 48 Stunden in Versuch 42) nach vier Tagen darbietet. Hier hat sich die Wirkung auf der sauren Seite bei  $p_H$ : 5.9 zu einer breiten Zone um  $n/1000000$  Jod durchgesetzt,

#### Versuch 43.

Kombination von Jod und Kupferchlorid bei variiertem pH mit und ohne Kochsalzlösung. Ansatz wie in den bisherigen Versuchen.

Aussaat nach 96 Stunden:

J <sub>2</sub> :		$\frac{n}{33333}$	$\frac{n}{100000}$	$\frac{n}{333333}$	$\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{3333333}$	$\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	CuCl <sub>2</sub> : $\frac{n}{1000000}$ mg/l 0,067
aq:	±	—	±	±	±	±	±	—
5.3	±	—	±	±	±	±	±	±
5.9	±	—	±	—	—	—	±	—
6.6	2	±	±	±	1	±	1	2
7.3	±	±	±	±	±	±	±	±
8.0	—	—	—	—	—	—	—	—
$\frac{n}{10}$ NaCl	—	—	—	—	—	—	—	—
5.3	1	—	—	±	±	±	±	±
5.9	±	—	—	—	±	±	±	±
6.6	1	—	±	—	—	—	±	—
7.3	—	—	—	—	—	—	—	—
8.0	—	—	—	—	—	—	—	—

und ist bei  $p_H$ : 8.0 vollkommene Sterilität eingetreten, wie in der entsprechenden Kupferkontrolle. In verstärktem Masse zeigt sich dieses Bild in dem zu  $n/10$  NaCl besalzenen Ansätze, bei welchem, mit dem gleichen Jodwerte gleichsam als Mittelpunkt, breite Desinfektionszonen nach beiden Seiten ausladen, um mit zunehmender Alkalität zu durchgehender Keimtötung der Reihen sich auszuweiten und damit den Kontrollen anzugleichen.

In diesen Zusammenhänge komme ich wieder auf Versuch 45 zurück, in welchem neben der Kombination Jod-Kupfer in destilliertem Wasser auch Grenzwerte phosphatgepufferter Lösungen gegen Subtilissporen zur Prüfung kamen. Dabei sind neben den sauren Kupferkontrollen und deren der Wasser-Kontrolle gleichkommender Wirkung zwei Momente bemerkenswert: Erstens kommt es in den alkalischen Reihen des Jod und der Kombination Jod + Kupferchlorid überhaupt nicht zu völliger Keimablötung. Zweitens aber tritt hier bei  $pH$  8.0 mit abnehmender Kupferkonzentration eine auffällige, additive Kupferwirkung in einer starken, relativen Keimverminderung zutage, welche die Jodhemmung in den Pufferlösungen, sowie die Jod-Kupfer-Hemmung in den höheren Kupferkonzentrationen mehr als ausgleicht. Darauf komme ich bei den Versuchen 50 und 68 noch einmal zurück.

Zusammenfassend lässt sich sagen: Die reine Jodwirkung zeigt sich in zum mindesten zwei Phasen, deren zweite in den höchsten Jodverdünnungen (um  $n/1000000$ ) ich als oligodynamisch bezeichnete. Der unter variierten Versuchsbedingungen variable Grad der Ionisierung kann zu mehr oder weniger starken Entkeimungseffekten führen. Unter diesen Bedingungen bilden der oxydative Angriff der Metalle, die Lösung bzw. Verteilung der Oxyde, Karbonate, Oxychloride oder sonstigen Umsetzungsprodukte in der wässrigen Phase und die Speicherungsmöglichkeit für dieselben in den verschiedenen Keimen als Testobjekten die wesentlichen Voraussetzungen der oligodynamischen Wirkung. Man muss aber wohl auch die Ionisierung kleiner Mengen anderer keimtötender Stoffe bei gleichzeitiger Speicherung und Wirkung in den zel-

ligen Testobjekten als oligodynamisch bezeichnen; u. zw. auch ohne dass es zum Nachweise feststehender Grenzwerte kommt; denn aus zahlreichen Beobachtungen über den Mechanismus der Desinfektion wissen wir, dass *die kleinsten Wirkungswerte nicht von feststehenden, chemischen Minimalwerten, sondern von variablen, biologischen Relationen abhängen*, wobei wir uns haben gewöhnen müssen, in wesentlichen Wirkungsbereichen geringere Konzentrationen wirksamer zu sehen als grössere. Die Ergebnisse der hier mitgeteilten Versuche sind ein Beitrag für diese nicht nur aus den chemisch-physikalischen Lösungsbedingungen, sondern wesentlich aus den biologischen Adsorptions- und Bindungsverhältnissen der Testobjekte verständlichen Wirkungsweisen (13).

Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration von der alkalischen nach der sauren Seite lässt die Jodwirkung zunehmen, wobei man an eine vorwiegend molekulare, kurzfristige Wirkung zu denken hat, welche sich so von der mehr oxydativen, prothahierten des Hypojodits im alkalischen Milieu unterscheidet. Auch Kupfer zeigt als klassisches Beispiel solche oligodynamischen Zonen in hohen Verdünnungen, entfaltet aber erst mit dem Übergang zu alkalischem Mittel ausserordentlich starke Wirkungsbreiten. Dabei ist zu beachten, dass die Pufferung an sich die Wirkung beider Elemente doch stark beeinträchtigt und nur in den genannten, optimalen pH-Reihen den Wasserkontrollen angleicht, u. U. diese in der Wirkungsbreite sogar übertrifft. Die Kombination Jod-Kupfer ist vorwiegend im alkalischen Bereiche wirksam; Kochsalz in  $n/10$  Normalität verstärkt sie mächtig; ähnlich, wenn auch nicht so stark, wirkte Leitungswasser, worauf ich bei den Versuchen 63 und ff. bis 69 noch zurückkommen muss.

## II. Versuche über die Kombination von Chlor mit Kupfer, bzw. von Chlor, Kupfer und Kochsalz.

In Versuch 50 ist ein Parallelversuch zu Versuch 38 angestellt, eine Grenzwertbestimmung für die Kombination Chlor und Kupferchlorid in destilliertem Wasser gegen Staphylo-

## Versuch 50.

Grenzwertbestimmung einer Kombination von Chlor und Kupferchlorid in destilliertem Wasser gegen Staphylokokken und Subtilissporen. Aussaat nach 24, und 72 St.:

Cl <sub>2</sub> :	$\frac{n}{33333}$	$\frac{n}{100000}$	$\frac{n}{333333}$	$\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{3333333}$	$\frac{n}{10000000}$	aq.	mg/l CuCl <sub>2</sub>
-------------------	-------------------	--------------------	--------------------	---------------------	---------------------	----------------------	-----	---------------------------

## Staphylokokken; n. 24 Std:

aq.	—	±	2	3	3	3	3	
CuCl <sub>2</sub> : $\frac{n}{33333}$	—	±	2	±	±	±	±	2.22
„ $\frac{n}{100000}$	—	±	2	2	1	1	3(?)	0.67
„ $\frac{n}{333333}$	—	±	2	3	3	3	±	0.22
„ $\frac{n}{1000000}$	—	±	2	4	4	4	4	0.067
„ $\frac{n}{3333333}$	—	±	2	4	4	4	4	0.022
„ $\frac{n}{10000000}$	—	±	2	4	4	4	4	0.0067

## Staphylokokken; n. 72 Std.:

aq.	—	—	—	—	—	—	±	
CuCl <sub>2</sub> : $\frac{n}{33333}$	—	—	—	—	—	—	—	2.22
„ $\frac{n}{100000}$	—	—	—	—	—	—	—	0.67
„ $\frac{n}{333333}$	—	—	±	±	—	±	—	0.22
„ $\frac{n}{1000000}$	—	—	±	±	±	±	±	0.067
„ $\frac{n}{3333333}$	—	—	±	±	1	1	1	0.022
„ $\frac{n}{10000000}$	—	—	±	±	1	1	1	0.0067

kokken und gegen Subtilissporen, u. zw. nach 24 Stunden und drei Tagen. Wie sich besonders eindrucksvoll nach 72 Stunden an Staphylokokken darstellt, verlaufen die Versuche mit Chlor grundsätzlich ebenso wie die mit Jod.

Cl <sub>2</sub> :	$\frac{n}{33333}$	$\frac{n}{100000}$	$\frac{n}{333333}$	$\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{3333333}$	$\frac{n}{10000000}$	aq.	mg/l CuCl <sub>2</sub>
-------------------	-------------------	--------------------	--------------------	---------------------	---------------------	----------------------	-----	---------------------------

*Subtilissporen,\* ) n. 24 Stdn.:*

aq.	7	22	26	29	24	43	12	
CuCl <sub>2</sub> : $\frac{n}{33333}$	100..	100..	100..	100..	100..	100..	100..	2.22
„ $\frac{n}{100000}$	100..	100..	100..	100..	100..	100..	100..	0.67
„ $\frac{n}{333333}$	19	72	100	>100	>100	60	35	0.22
„ $\frac{n}{1000000}$	27	35	70	80	100	35	34	0.067
„ $\frac{n}{3333333}$	15	17	28	40	31	42	39	0.022
„ $\frac{n}{10000000}$	55	60	80	50	65	60	60	0.0067

*Subtilissporen; n. 72 Stdn.:*

aq.	2	5	100..	100..	100..	100..	4	
CuCl <sub>2</sub> : $\frac{n}{33333}$	>100	11	18	100..	100..	100..	100	2.22
„ $\frac{n}{100000}$	27	14	8	9	13	14	40	0.67
„ $\frac{n}{333333}$	2	100	13	>100	>100	>100	100	0.22
„ $\frac{n}{1000000}$	3	16	16	16	19	23	19	0.067
„ $\frac{n}{3333333}$	1	8	5	18	18	14	10	0.022
„ $\frac{n}{10000000}$	5	8	10	14	11	20	17	0.0067
mg/L Cl <sub>2</sub> :		0.355		0.035		0.003		

\*) Einsaat etwa  $\frac{1}{10}$  Öse Subtilissporen. Die ausgewachsenen Kolonien sind gezählt: 100.. bedeutet Hunderte, > 100 = mehr als hundert Kolonien.

An den unteren Grenzwert des Kupfersalzes schliessen sich in den Stäben  $\text{CuCl}_2$  n/333333 und n/1000000 Hemmungszonen an, welche unter  $\text{Cl}_2$  n/3333333 oligodynamische Wirkung u. zw. bei absoluter Keimtötung bzw. sehr starker Keimverminderung aufweisen.

Die entsprechenden Versuchsreihen über die Kombinationswirkung Chlor-Kupfer gegen Subtilissporen zeigen nach 3 Tagen eine der Wasserkontrolle (vergl. Versuch 45) annähernd gleichkommende Wirkungsreihe bei  $\text{CuCl}_2$  n/100000, welcher sich eine breite Hemmungszone im folgenden Stabe bei  $\text{CuCl}_2$  n/333333 anschliesst.

In den weiteren Verdünnungen des Kupfers bis n/10000000 folgt nun eine starke, relative Keimverminderung, welche die Wirkung der Kombination Chlor-Kupfer in diesen hohen Verdünnungen der Wasserkontrolle annähernd angleicht, bei einigen mittleren Chlorwerten derselben sogar fast gleichkommt. Bei Durchsicht der vertikalen Stäbe sieht man nach dreitägiger Einwirkung der Kombination eine allmähliche Zunahme der relativen Keimverminderung von der Hemmung bei  $\text{CuCl}_2$  n/33333 in Richtung der abnehmenden Kupferkonzentrationen, welche von  $\text{CuCl}_2$  n/333333 ab der Chlor- bzw. der Wasserkontrolle etwa gleichkommt.

Die Kontrollen zeigen, dass Kupfer bei Sporen offenbar ganz andere quantitative Adsorptionsbedingungen vorfindet wie bei vegetativen Keimen, den Staphylokokken, welchen sich Paratyphusbazillen im wesentlichen ähnlich verhalten, wie sich in weiteren Versuchen zeigen wird. Kupfer an sich wirkt in den angewandten Konzentrationen schlecht, allenfalls entwicklungshemmend, und wird durch Chlor in dessen an sich nicht sporentötenden Konzentrationen vielfach noch gehemmt. Erst in hohen Verdünnungen des Kupfers von n/1000000 ab kommt es zu stärkerer Sporizidie, ohne dass innerhalb der gewählten Prüfungszeiten eigentlich die Wirkung des destillierten Wassers wesentlich überboten würde. Diese Empfindlichkeit der Subtilissporen zeigt sich nicht nur in destilliertem Wasser, sondern auch in dem verhältnismässig weichen Stockholmer Wasser. Vergl. besonders Versuch 69, sowie 63 ff.



Wie bei den Jodversuchen wurde nun auch der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf die Wirkung der Kombinationen Chlor-Kupfer und Chlor-Kupferkochsalz untersucht, u. zw. meistens mit der Kupferchloridkonzentration  $n/1000000$  (entspr. 0.067 mg/l, bzw. 0.032 mg/l Cu) durchgeführt.

#### Versuch 49.

Kombination von Chlor und Kupferchlorid bei variiertem pH. Ansatz: m/15 Phosphatpufferlösung 0.5 cc,  $\frac{1}{1000000}$  n  $\text{CuCl}_2$  0.5 cc,  $\frac{4}{X}$  n  $\text{Cl}_2$  0.5 cc, Staphylokokkenaufschwemmung entspr.  $\frac{1}{10}$  Öse 24-stdg. Kultur 0.5 cc. Aussaat nach 48 Stunden entspr.  $\frac{1}{500}$ — $\frac{1}{1000}$  der Einsaat:

pH-Kontr.		$\text{Cl}_2: \frac{n}{10000}$	$\frac{n}{33333}$	$\frac{n}{100000}$	$\frac{n}{333333}$	$\frac{n}{\text{Müll.}}$	$\frac{n}{3.3 \text{ Müll.}}$	$\frac{n}{10 \text{ Müll.}}$	$\frac{n}{1000000}$ $\text{CuCl}_2\text{-K.}$ (0.067mg/l- 0.032mg Cu)
aq	3	—	—	— (11)	±	±	3	2	
5.3	2	—	±	±	1	1	1	1	2
5.9	3	—	±	1	1	1	1	1	± (?)
6.6	3	—	1	2	2	2	±	2	2
7.3	3	—	±	1	1	1	±	1	±
8.0	1	—	—	± (36)	— (1)	± (21)	—	± (36)	± (29)
$\text{CuCl}_2$	:	—	—	±	1	1	1	1	1
mg/l Cl		3.5	1.06	0.35	0.1	0.035	0.01	0.003	

Nach Versuch 49 zeigt Chlor eine starke, mehrphasige Wirkung im Vergleich mit der erheblichen Hemmung der Chlor-kupferkombination. Im Vertikalstabe unter  $\text{Cl}_2$   $n/333333$  (0.01 mg/l) wächst die Wirkung der Kombination aber mit zunehmender Alkaleszenz zu absoluter Wirkung bei pH + 8.0 und breitet sich hier zu gleicher Wirkung horizontal aus.

Noch eindrucksvoller erweist sich die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Kombination Chlor-Kupfer in Versuch 53, in welchem der Chlorwirkung in der steigenden  $p_{\text{H}}$ -Reihe

## Versuch 53.

Vergleich fallender Mengen von Chlor bei variiertem pH mit einer Kombination von Chlor und Kupferchlorid ( $\text{CuCl}_2$  in der Konzentration  $n/1000000$  entspr. 0,067 mg/L, bzw. Cu entspr. 0,03 mg/L) gegen Staphylokokken. Ansatz wie bisher, Chlor zuletzt. Aussaat nach 48 Stunden:

$\text{Cl}_2$ :	$\frac{n}{10000}$	$\frac{n}{33333}$	$\frac{n}{100000}$	$\frac{n}{333333}$	$\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{3333333}$	$\frac{nn}{10000000}$	aq.
aq.	—	—	$\pm$	$\pm$	1	2	4	4
5.9	—	1	3	3	3	3	3	3
6.6	—	2	4	4	4	4	4	4
7.3	—	4	4	4	4	4	4	4
8.0	—	1	4	4	4	4	4	4
$\text{CuCl}_2$ : $\frac{n}{1000000}$	—	—	—8	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
$\text{CuCl}_2$ 5.9	—	$\pm$	1	2	2	2	2	2
› 6.6	—	2	2	2	2	4	2	3
› 7.3	1	1	1	1	$\pm$	$\pm$	$\pm$	1
› 8.0	—	$\pm$	—22	$\pm 37$	—16	—12	—12	$\pm$
mg/l Cl:	3.55		0.355		0.035		0.003	

die Wirkung der Kombination gegenübergestellt ist. Dem Bilde der Chlorwirkung und dessen Einengung durch die Phosphate, steht die Kombination Chlor-Kupfer mit ihrer Wirkungssteigerung im alkalischen Bereiche gegenüber, welche sich bei  $p_H$ : 8.0 zu breiten, fast absoluten Keimtötungszonen ausweitet, d. h. um mehr als das Dreihundertfache, wenn es anginge, hier die Chlorquanten als Massstab anzuwenden, um die mit der Kombination Chlor-Kupfer erzielte, keimtötende Wirkung zu bemessen: das geht aber für Desinfektionsprozesse ebensowenig an, wie für andere biologische, etwa die Antikörperwirkungen, einschliesslich der antitoxischen und antiinfektiösen; es sei denn, dass es sich um technische Notbehelfe, z. B. bei der Wertbemessung handele.

Weitere Versuche zeigen die Bedeutung des Zusatzes kleiner, fallender Mengen von Kochsalz zur Kombination Chlor-Kupfer. Unter dem Einflusse dieser geringen Zusätze verschie-

ben sich die durch die Kombination Chlor-Kupfer in alkalischem Milieu bedingten Keimtötungszonen und weiten sich mächtig aus. Gegen Staphylokokken wirkt sich das paradoxerweise mit abnehmender Menge des Kochsalzes verstärkend auf den Keimtötungseffekt aus, und ist auch gegen Mäusetyphusbazillen ausgesprochen.

*Zusammenfassend ist bei diesen Versuchen zu sagen: Wie Jod wird auch Chlor durch Kupferchlorid gehemmt oder umgekehrt, u. zw. besonders in sauerem Wasser (pH: 5.3); bei alkalischer Reaktion dagegen wird die Kombination Chlor-Kupfer zunehmend wirksamer, und tritt nun eine zonenartige, additive Verstärkung der keimtötenden Wirkung ein, welche besonders um  $n/1000000$  der Lösungen beider Komponenten zutage tritt.*

*Wie meine Versuche gezeigt haben, wirken die Halogene in schwach sauerem Wasser (etwa 5.9 pH) bedeutend stärker als in alkalischen (pH: 8.0). Die Erklärung hierfür wurde darin gesehen, dass die Halogene in sauerem Mittel vorwiegend molekular und entsprechend ihrem Gasdrucke mehr oder weniger momentan, in alkalischem dagegen mehr oxydativ aus der Hypochloritform heraus und damit langsamer in Reaktion treten und zur Wirkung kommen.*

*Kupfersalze dagegen werden in schwach alkalischem Wasser ausserordentlich verstärkt. Kombinationen von Halogenen mit Kupfersalzen haben wegen dieses gegensätzlichen Verhaltens vorerst keine Verstärkung der beiderseitigen Wirkung erwarten lassen, was auch für die bisher geprüften Kombinationen Jod- bzw. Chlor-Kupferchlorid zutrifft, soweit die »Grenzwerte« der Komponenten in Frage kommen. Um die Grenzwerte treten nämlich breite Hemmungszonen auf, in welchen die Kupferwirkung besonders bis zu fast völliger Aufhebung beeinträchtigt wird.*

In den höheren Verdünnungen der Halogene (Jod und Chlor) treten aber wieder — und zwar besonders im sauren Bereiche — Wirkungszonen auf, welche bei Kombination mit kleinen Kupferdosen zu additiver Verstärkung der Keimtötung u. zw., auf der alkalischen Seite führen. Fügt man zu diesen

Kombinationen noch kleine Mengen Kochsalz, so kommt es zu einer weiteren, kräftigen Verstärkung der keimtötenden Wirkung u. zw. ebenfalls auf der alkalischen Seite, wie sie dem Alkalichloriden entspricht. Dabei treten paradoxe Wirkungen hervor, indem die oligodynamisch wirksamen Halogen-Kupfer-Kombinationen z. B. durch fallende Kochsalzkonzentrationen, welche weit unter der physiologischen Breite liegen ( $n/1000$ — $n/10000$  NaCl entspr. 58.5—5.85 mg/l), mächtig verstärkt werden (vergl. besonders Versuche 61 und 74).

Man möchte die Verstärkung der hemmenden Wirkung der Kupfersalze und der Halogene auf einander wohl damit erklären, dass in den gepufferten Lösungen mit deren Überschuss an Phosphaten das Kupfer von der Phosphorsäure gebunden wird und daraus nur in alkalischem Milieu von den Keimen aufgenommen wird. Damit werden aber die Wirkungszonen gerade der hohen Verdünnungen und deren Verstärkung durch ungefähr entsprechend hohe Verdünnungen der Halogene und weiterhin durch so kleine Kochsalzzusätze nicht befriedigend erklärt.

### III. Die Bedeutung der demonstrierten und erörterten Desinfektionsmechanismen für die Gewinnung einiger praktischer Gesichtspunkte zur Desinfektion von Trink- und Brauchwasser.

#### 1) Das Chlorungsverfahren.

Mit Rücksicht auf die verschiedenen Stadien des Wasserreinigungsprozesses, auf die Neutralsalze des Wassers (vertreten durch Natriumchlorid), auf die Wasserstoffionenkonzentration (wesentlich beeinflusst durch Zusätze (Calciumhydroxyd, Soda u. a.)), schliesslich den Chlorüberschuss des chlorierten Reinwassers, war es von grossem Interesse, die Bedingungen der Chlordesinfektion an successiven Proben von Trinkwasser und an grob modellmässig nach den angegebenen Gesichtspunkten zusammengestellten Kombinationen vergleichend zu prüfen und auch die Kupferung des Wassers in diesen Vergleich mit einzubeziehen.

Ich habe nun diese Proben u. zw. Rohwasser, Langsamfiltrat und Reinwasser, 1) unter Chlorung in fallenden Konzentrationen und 2) unter Chlorung bei gleichzeitigem Zusatz von Kupferchlorid, in ihrer keimtötenden Wirkung verglichen mit einer Kochsalzlösung von gleichem Gehalte an Chloridchlor und bei den Varianten der Wasserproben ungefähr entsprechenden und variierten  $p_H$ -Werten (: 7.5 bzw. nur 8.3, da ich neben den Phosphatpuffern nicht noch andere Puffer zur Anwendung bringen wollte, z. B. Glykokoll, was zu weiteren Fehlern — über die durch eine Pufferart an sich schon bedingten noch hinaus — führen muss), ferner mit einer Kupferchloridlösung von  $n/1000000$  und schliesslich mit einer Kombination beider unter entsprechenden Bedingungen der Chlorung und alle gegen Staphylokokken, Paratyphus — B — Bazillen, und Subtilissporen geprüft.

Das Ergebnis ist in den Tabellen 63 und 64 dargestellt. Es zeigt sich dabei der in den vorangegangenen Versuchen nachgewiesene Chlor-Kupfer-Effekt bzw. Chlor-Kupfer-Kochsalzeffekt in alkalischem Mittel. In beiden Kombinationen erscheint die Wirkungsgrenze bei  $Cl_2$ :  $n/10000000$  noch nicht erreicht. Die Kupferkontrollen zeigen eine starke Resistenz der als Testobjekt verwendeten Mäusetyphusbazillen. Nach 48 Stunden ist das Bild typisch entwickelt, und haben auch Rohwasser und Langsamfiltrat ihre schmalen Desinfektionszonen wirksam verbreitert. In Versuch 64 kommt die Kochsalzverstärkung der Kombination Chlor-Kupfer mit der geringen Besatzung von  $n/1485$  Kochsalz schön zur Wirkung, welcher die Reihen von Rohwasser und besonders von Langsamfiltrat durchaus befriedigend entsprechen.

In dem *Doppelversuche* 66, welcher gegen Mäusetyphusbazillen und gegen Staphylokokken angesetzt war, zeigen die Chlorkochsalz- (siehe besonders Versuch 66 gegen Staphylokokken) und vor allem die Chlor-Kochsalz-Kupferkombination die erwartete Verstärkung, bzw. starke Ausweitung der Wirkungszonen mit zunehmender Alkaleszenz. Die Wasserproben der verschiedenen Phasen des Wasserreinigungsprozesses verhalten sich im ganzen genommen durchaus analog,

## Versuch 63.

Vergleich der Chlorwirkung in Kombination mit NaCl und CuCl<sub>2</sub>, bzw. mit CuCl<sub>2</sub> + NaCl in destilliertem Wasser mit der in Proben verschiedener Phasen des Wasserreinigungsprozesses im Wasserwerk Lovö, mit Rücksicht auf deren Wasserstoffionenkonzentration und Chloridchlorgehalt (33 mg/L) sowie auf den Chlorüberschuss im Reinwasser (0,13 mg/L). Einsaat  $\frac{1}{50}$  Öse 24-stdg. Kultur von Paratyphus-B-Bazillen, Aussaat n. 24 Stunden:

Cl <sub>2</sub> :	$\frac{n}{10000}$	$\frac{n}{33333}$	$\frac{n}{100000}$	$\frac{nn}{333333}$	$\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{3 \text{ Mill.}}$	$\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	aq.	mg/l:	
									CuCl <sub>2</sub>	(Na)Cl
aq.	—	—	—	—	$\pm$	3	4	4		
7.5	$\pm$	—	4	4	4	4	4	4		
8.3	$\pm$	—	2	3	—	3	4	4		
NaCl $\frac{n}{1485}$	—	—	—	$\pm$	$\pm$	$\pm$	1	4		24.0
„ 7.5	$\pm$	—	4	4	4	4	4	4		„
„ 8.3	$\pm(50)$	—	2	4	4	4	4	4		„
CuCl <sub>2</sub> $\frac{n}{\text{Mill.}}$	—	—	—	—	1	2	$\pm(30)$	3	0.067	
„ 7.5	$\pm$	—	2	4	2	2	4	3	„	
„ 8.3	$\pm$	—	$\pm$	—	—	—	—	3	„	
CuCl <sub>2</sub> + NaCl $\frac{n}{1485}$	—	—	$\pm 29$	2	2	3	$\pm$	3	„	„
„ 7.5	$\pm$	—	2	1	—	3	$\pm$	3	„	„
„ 8.3	$\pm$	—	—	—	—	$\pm 43$	—	2	„	„
Reinwasser pH:	7.5	—	4	4	4	4	4	4		
„ „	„	—	4	2	2	—	4	3	„	„
Langsamfiltrat, pH: 8.5	„	—	4	4	4	4	4	4		
„ „	„	—	3	4	$\pm$	1	$\pm$	3	„	„

um beim Reinwasser, welches von Versuch 66 ab ebenfalls den fallenden Chlorreihen angeschlossen wurde, mit der Kupferung fast den Desinfektionsablauf der entsprechenden Modellkombination zu erreichen. Ich lasse es doch dahingestellt und behalte mir weitere Versuche darüber vor, ob etwa

noch vorhandenen freien Chlorresten und nicht viel mehr dem höheren Alkaleszenzgrade des Reinwassers diese starke Angleichung der Wirkung des Reinwassers an die Wirkung des Modellversuches mit destilliertem Wasser zuzuschreiben sei.

Versuch 63 n. 48 Stunden:

Cl <sub>2</sub> :		$\frac{n}{10000}$	$\frac{n}{33333}$	$\frac{n}{100000}$	$\frac{nn}{333333}$	$\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{3 \text{ Mill.}}$	$\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	aq.	mg/l:	
										CuCl <sub>2</sub>	(Na)Cl
	aq.	—	—	—	—	—	3	4	4		
	7.5	$\pm$	—	3	3	3	—	4	4		
	8.3	—	—	$\pm$	3	—	3	4	4		
NaCl	$\frac{n}{1485}$	—	—	—	—	—	$\pm$	$\pm$	4		24.0
„	7.5	—	—	1	3	4	4	4	4		„
„	8.3	—	—	$\pm$	1	4	4	4	4		„
CuCl <sub>2</sub>	$\frac{n}{\text{Mill.}}$	—	—	—	—	$\pm$	1	—	3	0.067	
„	7.5	—	—	$\pm$	1	$\pm$	$\pm$	2	4	„	
„	8.3	—	—	—	—	—	—	—	3	„	
CuCl <sub>2</sub> + NaCl	$\frac{n}{1485}$	—	—	—	$\pm$	$\pm$	2	—	3	„	„
„	7.5	—	—	1	—	—	3	—	3	„	„
„	8.3	—	—	—	—	—	—	—	2	„	„
Rohwasser pH:	7.5	—	—	4	4	4	4	4	4		
„	7.5	—	—	3	1	$\pm$	—	3	3	„	
Langsamfiltrat, pH:	8.5	—	—	2	4	4	4	4	4		
„	„	—	—	1	2	$\pm(26)$	$\pm$	$\pm$	2	„	
Reinwasser: pH	8.5	{ (ohne Chlorzusatz! Chlorüberschuss: vor acht Tagen!): 0.11 mg/l.								4	
„	„									$\pm$	„
Cl: mg/l:		3.5500		0.3550		0.0355		0.0035			

Die Wirkung des Calciums, Magnesiums, Aluminiums und anderer Kationen sind in diesen Versuchen nicht berücksich-

## Versuch 61.

Versuchsanordnung wie in Versuch 63. Einsaat 1 s. öse 24 stündiger Kultur von *Staphylococcus aureus*. Asaat nach 24 Stunden:

Cl <sub>2</sub> :	n 1000	n 2000	n 3000	n 4000	n 5000	n 6000	n 7000	n 8000	%	mg/l Cl <sub>2</sub> - (NaOCl)
aq	—	—	—	—	2	2	2	2	2	
7.5	1	2	3	3	4	4	4	4	4	
8.3	2	2	2	2	3	3	1	3	3	
n 1485 NaCl	—	—	—	—	2	1	2	4	4	240
7.5	1	2	2	3	3	4	4	5	5	
8.3	2	2	1	3	2	2	2	2	2	
n Mill. CuCl <sub>2</sub>	—	—	—	1	—	—	—	—	—	1000
7.5	2	2	2	1	2	2	2	2	2	
8.3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
CuCl <sub>2</sub> + n 1485 NaCl	—	—	—	—	1	1	—	—	—	
7.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
8.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Lehwasser: pH 7.5	—	2	3	3	2	3	3	3	3	
+ CuCl <sub>2</sub>	—	—	—	—	—	1	—	—	—	
Langsamfiltrat pH 8.5	—	2	2	—	3	3	3	3	3	
+ CuCl <sub>2</sub>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Leinwasser (pH 8.5)	ohne Chlorzusatz! (Chlorüberschuss vor 11 Tagen 0.11 mg/l)								2	
+ CuCl <sub>2</sub>										
l: mg/l:	3.550	0.355	0.035	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001		

ligt worden, soweit dieselben neben der Steigerung der aktuellen Reaktion durch Hydroxylionen ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) etwa noch hemmende oder fördernde Wirkung auf die Leintötenden Faktoren ausüben sollten, wie das bei deren chemischem Umsetzungsvermögen in der Lösung und deren entquellender, bzw. fällender Wirkung auf Eiweiss ohne genaueste Analyse und Versuche nicht vorausgesagt werden kann. Das Gleiche gilt für die Anionen (Nitrate, Sulfate u. a.), welche hier nicht berücksichtigt wurden.



Versuch 66.

Versuch zum Vergleich der Chlorwirkung in Kombination mit NaCl ( $\frac{n}{1632}$  entspr. 21.75 mg/l:Cl), bzw. mit NaCl ( $\frac{n}{1632}$ ) + CuCl<sub>2</sub> ( $\frac{n}{\text{Mill.}}$ ) in destilliertem Wasser und bei pH-Grenzwerten entspr. den Optimen für Kochsalz und Kupferchlorid mit der Chlorwirkung in Proben verschiedener Phasen des Wasserreinigungsprozesses im Wasserwerk Lovö, mit Rücksicht auf deren pH und Chloridchloridgehalt (30 mg/L) sowie den Chlorüberschuss im Reinwasser (0.14 mg/L). Einsaat: a)  $\frac{1}{50}$  Öse Breslaubaz., b) Staphylokokken.

Aussaat n. 24 St.:

Cl <sub>2</sub> :		$\frac{n}{33333}$	$\frac{n}{100000}$	$\frac{n}{333333}$	$\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{3333333}$	$\frac{n}{10000000}$	$\frac{nn}{33333333}$	aq.	· mg/l	
										CuCl <sub>2</sub>	Cl(Na)
a)	NaCl $\frac{n}{1632}$	2	3	2	2	2	2	3	4		22.0
	„ 7.3	—	2	2	2	3	4	4	4	„	„
	„ 8.3	—	1	1	2	2	2	3	2	„	„
NaCl + CuCl <sub>2</sub> s. o.		—	—	1	1	±	—	—	±	0.067	„
„ 7.3		—	1	2	2	—	3	3	2	„	„
„ 8.3		—	±	±	—	—	—	±	—	„	„
Rohwasser: pH 7.3		—	3	3	3	3	3	3	4	„	„
„ + CuCl <sub>2</sub>		—	±	2	1	1	1	±	1	„	„
Langsamfiltr. 8.5		—	4	4	4	4	4	4	4	„	„
„ + CuCl <sub>2</sub>		—	1	±	±	±	±	±	±	„	„
Reinwasser: pH 8.6		—	±	4	4	4	4	4	4	„	„
„ + CuCl <sub>2</sub>		—	—	±	±	—	—	±	±	„	„
b)	NaCl $\frac{n}{1632}$	—	±	1	1	1	1	±	1		22.0
	„ 7.3	—	1	2	2	2	2	2	2	„	„
	„ 8.3	—	±	±	±	±	±	±	±	„	„
NaCl + CuCl <sub>2</sub> s. o.		—	—	—	—	—	—	—	—	0.067	„
„ 7.3		—	±	±	—	±	±	±	±	„	„
„ 8.3		—	—	—	—	—	—	—	—	„	„
Rohwasser: pH 7.3		—	2	3	3	3	3	3	4	„	„
„ + CuCl <sub>2</sub>		—	—	—	—	—	—	—	—	„	„
Langsamfiltr. 8.5		—	—	3	3	2	2	2	3	„	„
„ + CuCl <sub>2</sub>		—	—	—	—	—	—	—	—	„	„
Reinwasser: pH 8.6		—	—	±	±	1	2	2	2	„	„
„ + CuCl <sub>2</sub>		—	—	—	—	—	—	—	—	„	„
Cl: mg/l:			0.355		0.035		0.003				

Versuch 68.

Vergleich der Wirkung fallender Mengen von Chlor in Kombination mit Kochsalz bzw. mit Kochsalz und variierten Mengen von Kupferchlorid in zu  $\frac{n}{60}$  phosphatgepuffertem, destilliertem Wasser von pH: 8.3 mit der Chlorwirkung im Reinwasser des Wasserwerkes Lovö, mit besonderer Rücksicht auf des letzteren Wasserstoffionenkonzentration, Chloridchlorgehalt und Chlorüberschuss.

Einsaat  $\frac{1}{50}$  Öse 24-stgd. Kultur von Paratyphus-B-Bazillen. Aussaat nach 24, 48 Stunden u. n. 7 Tagen:

Cl <sub>2</sub> :	$\frac{n}{10000}$	$\frac{n}{100000}$	$\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	$\frac{n}{100 \text{ Mill.}}$	aq.	mg/l (Na)Cl CuCl <sub>2</sub> (Cu)
n. 24 Stdn.							
$\frac{n}{1632}$ NaCl (pH 8.3)	—	—	4	3	3	2	22
„ + CuCl <sub>2</sub> $\frac{n}{100000}$	—	—	—	—	—	—	„ + 0.67 (32Cu)
„ + „ $\frac{n}{\text{Mill.}}$	—	—	3	2	2	±	„ + 0.067
„ + „ $\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	—	—	3	2	4	2	„ + 0.0067
„ + „ $\frac{n}{100 \text{ Mill.}}$	—	—	2	1	4	2	„ + 0.0007
Reinwasser (pH 8.6)	—	—	3	±	3	3	„
„ + CuCl <sub>2</sub> $\frac{n}{100000}$	—	—	—	—	—	—	„ + 0.67
„ + „ $\frac{n}{\text{Mill.}}$	—	—	2	±	2	±	„ + 0.067
„ + „ $\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	—	—	3	3	4	2	„ + 0.0067
„ + „ $\frac{n}{100 \text{ Mill.}}$	—	±	2	2	4	2	„ + 0.0007
n. 48 Stdn.							
$\frac{n}{1632}$ NaCl (pH 8.3)	—	—	3	3	2	1	„
„ + CuCl <sub>2</sub> $\frac{n}{100000}$	—	—	—	—	—	—	„ + 0.67
„ + „ $\frac{n}{\text{Mill.}}$	—	—	2	±	±	±(ca 100)	„ + 0.067
„ + „ $\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	—	—	1	1	2	1	„ + 0.0067
„ + „ $\frac{n}{100 \text{ Mill.}}$	—	—	1	±	3	2	„ + 0.00067

(Fortsetzung).

Versuch 68 (Fortsetzung).

Cl <sub>2</sub> :		$\frac{n}{10000}$	$\frac{n}{100000}$	$\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	$\frac{n}{100 \text{ Mill.}}$	aq.	mg l (Na)Cl CuCl <sub>2</sub> (Cu)
Reinwasser	(pH8.6)	—	—	2	—	3	3	„
„	+ CuCl <sub>2</sub> $\frac{n}{100000}$	—	—	—	—	—	—	„ + 0.67
„	+ „ $\frac{n}{\text{Mill.}}$	—	—	1	—15	±	—8	„ + 0.067
„	+ „ $\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	—	—	3	3	3	±	„ + 0.0067
„	+ „ $\frac{n}{100 \text{ Mill.}}$	—	±	1	±	2	±	„ + 0.00067
n. 7 Tagen								
$\frac{n}{1632}$	NaCl (pH8.3)	—	—	2	1	1	1	„
„	+ CuCl <sub>2</sub> $\frac{n}{100000}$	—	—	—	—	—	—	„ + 0.67
„	+ „ $\frac{n}{\text{Mill.}}$	—	—	1	±	±	±(41)	„ + 0.067
„	+ „ $\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	—	—	3	2	2	1	„ + 0.0067
„	+ „ $\frac{n}{100 \text{ Mill.}}$	—	—	1	±	2	2	„ + 0.00067
Reinwasser	(pH8.6)	—	—	1	—	3	2	„
„	+ CuCl <sub>2</sub> $\frac{n}{100000}$	—	—	—	—	—	—	„ + 0.67
„	+ „ $\frac{n}{\text{Mill.}}$	—	—	±(27)	—(24)	—12	—	„ + 0.067
„	+ „ $\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	—	—	3	3	3	±	„ + 0.0067
„	+ „ $\frac{n}{100 \text{ Mill.}}$	—	—	±	±	±	—6	„ + 0.00067
Cl: mg/l:		3.55	0.3555	0.0355	0.0035	0.0003		

Die additive Chlor-Kochsalzwirkung bei den geringen NaCl-Konzentrationen ( $n/1632$ ) tritt, wie schon erwähnt, wieder besonders stark gegen Staphylokokken hervor, u. zw. im Kochsalzmodell wie auch im Langsamfiltrat und im Reinwasser mit deren vergleichsweise höherem Alkalitätsgrad; der Chlor-Kupfer-Kochsalzkontrolle bei  $p_H$ : 8.3 entspricht die starke Wirkungssteigerung aller Proben bei Kupferzusatz. Offenbar schränken die Phosphate in der Chlor-Kupfer-Koch-

salzkontrolle bei  $p_H$ : 7,3 die keimtötende Wirkung der Kombination im Vergleich schon mit dem gekupferten Rohwasser von gleichem  $p_H$  bedeutend ein; Staphylokokken sind anscheinend unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen bedeutend empfindlicher als Paratyphus-B-Bazillen.

In *Versuch 68* sind fallende Mengen von Chlor mit fallenden Äquivalenten von Kupferchlorid und mit n/1632 Kochsalz bei  $p_H$  8,3 gegen Mäusetyphusbazillen kombiniert und mit der Wirkung von Reinwasser und dessen entsprechend gechlorten und gekupferten Reihen verglichen. Schon nach 24 Stunden zeigt Reinwasser eine kräftige Abtötungszone unter  $Cl_2$  n/1000000, welche sich nach 48 Stunden als steril erweist. Im ganzen ist Reinwasser auch bei der Chlorkupferung dem Modell überall überlegen und hemmt nicht wie dieses die durchdringende, protrahierte Kochsalz-Kupferwirkung, welche sich in den höheren Verdünnungen (n/10—100 Million.) gegen die Phosphatpufferung, besonders auch in den Wasserkontrollen, nicht durchzusetzen vermag.

Grundsätzlich das gleiche Bild, wenn auch mit den Besonderheiten der höheren Sporenresistenz, besonders gegen Kupfer, bietet *Versuch 69* dar, in welchem die gleichen Modellkombinationen Chlor-Kochsalz, bzw. Chlor-Kochsalz-Kupferchlorid wie in Versuch 68 im Vergleich mit Reinwasser gegen Subtilissporen zur Anwendung kamen.

Die Modellkombination weist nach drei Tagen breite Hemmungszonen auf u. zw. in den höheren Kupferkonzentrationen mit höheren Chlorverdünnungen; erst in der höchsten Kupferverdünnung weicht die Chlorhemmung des Kupfers einer der Kupferkontrolle sich angleichenden, vielleicht sogar zunächst verstärkten Wirkung.

Das Reinwasser zeigt in der Kombination mit Kupfer von Anfang an nur geringe Hemmung, von n/1000000  $CuCl_2$  an nur mehr zunehmende, keimtötende Wirkung bis einschliesslich n/10000000  $CuCl_2$ . Nach 6 Tagen nimmt diese Wirkung noch beträchtlich zu und lässt unter  $Cl_2$  n/100000 (: 0.355 mg/l  $Cl_2$ ) sowohl in Reinwasser allein, als auch bei Kupferung von n/Million. bis n/100 Million. keinen Keim mehr übrig; die

Versuch 69.

Wie Versuch 68, gegen Subtilissporen. Einsaat je  $\frac{1}{50}$  Öse etwa drei Monate alter Kultur. Aussaat n. 3 und 6 Tagen:

Cl <sub>2</sub>	$\frac{n}{10000}$	$\frac{n}{100000}$	$\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	$\frac{n}{100 \text{ Mill.}}$	aq.	mg/l (Na)Cl CuCl (Cu)
$\frac{n}{1632}$ NaCl/pH8.3	—	>100	>100	>100	>100	>100	22
„ + CuCl <sub>2</sub> $\frac{n}{100000}$	—	3	39	100	>100	60	„ + 0.67 (0.32Cu)
„ + „ $\frac{n}{\text{Mill.}}$	—	20	>200	>200	100	25	„ + 0.067
„ + „ $\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	—	60	>200	100	50	68	„ + 0.0067
„ + „ $\frac{n}{100 \text{ Mill.}}$	—	14	41	32	38	68	„ + 0.00067
Reinwasser/pH8.6	—	—	>100	>200	9	25	22 +
„ + CuCl <sub>2</sub> $\frac{n}{100000}$	1	—	60	50	80	60	„ + 0.67
„ + „ $\frac{n}{\text{Mill.}}$	—	—	25	18	32	24	„ + 0.067
„ + „ $\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	—	1	25	11	55	10	„ + 0.0067
„ + „ $\frac{n}{100 \text{ Mill.}}$	—	2	25	60?	60?	60?	„ + 0.00067
$\frac{n}{1632}$ NaCl/pH8.3	—	100...	100...	100...	>100	>100	22 +
„ + CuCl <sub>2</sub> $\frac{n}{100000}$	1	>100	100...	100...	>100	>100	„ + 0.67
„ + „ $\frac{n}{\text{Mill.}}$	—	11	35	46	45	85	„ + 0.067
„ + „ $\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	—	35	>100?	22	43	42	„ + 0.0067
„ + „ $\frac{n}{100 \text{ Mill.}}$	—	38	72	80?	60?	46	„ + 0.00067
Reinwasser/pH8.6	—	—	17	23	33	6	22 +
„ + CuCl <sub>2</sub> $\frac{n}{100000}$	1	1	8	5	5	40	„ + 0.67
„ + „ $\frac{n}{\text{Mill.}}$	1	—	8	5	12	34	„ + 0.067
„ + „ $\frac{n}{10 \text{ Mill.}}$	2	—	8	9	5	17	„ + 0.0067
„ + „ $\frac{n}{100 \text{ Mill.}}$	—	—	8	5	26	13	„ + 0.00067
Cl: mg/l:	3.55	0.355	0.0355	0.0035	0.0003		

höheren Chlorverdünnungen zeigen noch bis 0,00035 mg/l eine beträchtliche Keimverminderung, wie sie etwa der Reinwasserkontrolle entspricht und wahrscheinlich im wesentlichen als durch Chlor-Kupfer leicht gehemmte Salzalkaliwirkung anzusehen ist.

Es würde sich verlohnen, diese Mechanismen noch genauer zu analysieren und deren praktischer Bedeutung für die Desinfektion weiter nachzugehen. Was die Wasserdesinfektion betrifft, dürften sich schon jetzt aus der Kombinationswirkung von Chlor mit Kochsalz, bzw. mit Metallen und Kochsalz für Rohwasser verschiedener Beschaffenheit einige wichtige Gesichtspunkte ergeben, worauf ich nach den Silberversuchen zurückkommen werde.

Auf die angeschlossenen *Silberversuche* ist noch mit einigen Worten zu verweisen: Wie Kupfer ist auch Silber aus alkalischer Lösung am besten wirksam. Ich weise dabei auf meine früheren Arbeiten hin (14). Wie Kupfer ist auch Silber zweiphasig in seiner Wirkung; die zweite Phase ist dabei ein Übergang von Hemmung durch geringe, mittlere Dosen zur Wirkung kleinster Silberkonzentrationen und endlich zur »reinen« Wasserwirkung. (Siehe vorige Mitteilung, Versuch 19, 37 u. a. (12), Sporenversuche mit Kupfer 45, 50, 69).

Diese zweite Wirkungsphase tritt auch bei Kombination von Chlor und Silber hervor, gerade wie bei den Jod-Kupfer- und Chlor-Kupferversuchen.

Versuch 61 zeigt die Kombination Chlor-Silbersulfat bei  $p_{H^+}$ -Grenzwerten gegen Staphylokokken. Entsprechend der oligodynamischen Phase bei  $Cl_2$  n/3333333 tritt schon bei Chlor allein in alkalischem Milieu ( $p_{H^+}$  8.0) die Doppelphase (bei n/3333333 bzw. n/10000000 in Erscheinung). Diese Doppelphase tritt bei den variierten Silberzusätzen überall jeweils schon im wässerigen Ansatz der Kombination deutlich an gleicher Stelle auf, um sich in den entsprechenden alkalischen Reihen für  $Ag_2SO_4$  n/1000000 zu einer durchgehenden Reihe absoluter Wirkung auszuweiten und auch für die 10-bzw. 100-fache Silberverdünnung noch zu starker zweiphasiger Wirkungsverbreiterung durchzusetzen.

## Versuch 61.

Kombination von Chlor mit Silber bzw. mit Kochsalz bei pH-Grenzwerten gegen Staphylokokken.

Einsaat  $\frac{1}{10}$  Öse 48-stdg. Kultur von Staph. aur. Aussaat nach 48 Stunden:

Cl <sub>2</sub>	$\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{3333333}$	$\frac{n}{10000000}$	$\frac{n}{33333333}$	$\frac{n}{100000000}$	aq.	mg/L Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : (Ag)
aq.	±	±	3	1	3	4	
5.9	2	2	3	1	3	3	
8.0	4	2	3	4	1	4	
Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> $\frac{n}{1000000}$	—	±	±	±	±(30)	—	0.156: (0.108)
„ 5.9	±	±	±	±	±	±	n.24Std
„ 8.0	—	—	—	—	—	±	(27)
„ $\frac{n}{100000000}$	±	±	±	3	2	1	0.0016 (0.011)
„ 5.9	3	1	3	1	2	1	
„ 8.0	±	±	±	2	±	±	
„ $\frac{n}{1000000000}$	2	±	3	3	2	±	0.0016 (0.0011)
„ 5.9	3	3	3	3	2	2	
„ 8.0	2	±	1	2	±(35)	2	
NaCl $\frac{n}{100}$	1	2	2	2	2	2	585.00
„ 5.9 „	3	2	2	2	2	3	
„ 8.0 „	2	2	1	±	3	2	
„ $\frac{n}{1000}$	1	1	2	1	2	2	58.50
„ 5.9 „	±	±	±	±	±	±	n.72Std
„ 8.0 „	±	±	±	1	±	1	
„ $\frac{n}{10000}$	3	3	3	2	2	3	5.85
„ 5.9 „	3	3	3	2	2	3	
„ 8.0 „	2	±	1	2	±	±	

Dem Chlorsilberversuch ist im gleichen Arbeitsgange ein Chlor-Kochsalzversuch angehängt, der bei den gewählten NaCl-Konzentrationen die überaus starke, relative Keimverminderung darbietet, welche sich bei fallenden Konzentrationen von Kochsalz verstärkt und bei  $n/1000$  und  $n/10000$  NaCl ebenfalls, im Vergleich mit der einphasigen Wirkung bei  $n/100$  NaCl, als zweiphasig darstellt. Beachtenswert sind auch hier wieder die alkalischen Phosphatpufferkontrollen, welche in gleicher Richtung der abnehmenden Kochsalzkonzentration eine starke, zunehmende Keimverminderung aufweisen.

Weitere Versuche zeigen an Staphylokokken und Mäuse-typhusbazillen die starke und paradoxe Wirkungssteigerung der Kombination Chlor-Silber durch kleine und kleinste Kochsalzzusätze. Bezüglich dieser Wirkungsweise des Kochsalzes lässt sich sagen, dass unter den gewählten Bedingungen *so- wohl die Halogene (Jod und Chlor) wie auch Kupfer, besonders aber die Kombination beider und ebenso die entsprechenden Kombinationen mit Silber durch Chlornatrium, auch in Gegenwart — ja gerade in Gegenwart von Phosphatpuffern (wie ich früher für Silber zeigen konnte, auch in Gegenwart von organischen Puffern, nämlich Serum-eiweiss (14)) eine unerwartet grosse Wirkungsverstärkung erfahren, welche die Kupfer- bzw. Silberwirkung nicht nur an die Grenzwerte der »reinen Wirkung«, sondern unter den geeigneten Voraussetzungen weit darüber hinaus in den Bereich oligodynamischer Wirkung führt.*

## 2) Kupfer und Kochsalz.

In den oben mitgeteilten Versuchen wurden die Kombinationen Halogen (J und Cl) + Schwermetallsalz ( $\text{CuCl}_2$  und  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ) durch Kochsalz bedeutend verstärkt u. zw. namentlich mit fallenden Mengen des Chlorids. Diese Wirkung ist nun eingehender an der Kombination  $\text{CuCl}_2$  + NaCl in destilliertem Wasser und in  $m/60$  Phosphatpufferlösung ( $p_{\text{H}}-8$ ) untersucht worden.

Aus der Übersicht des Versuches 74 ergibt sich, dass die



Versuch 74.

Kombination von Kupferchlorid und Natriumchlorid in destilliertem Wasser und mit Phosphatpuffern bei pH 8.3 gegen  $\frac{1}{50}$  Öse Staphylokokken nach rund 18 Stunden:

CuCl <sub>2</sub> :		$\frac{n}{100}$	$\frac{n}{1000}$	$\frac{n}{10000}$	$\frac{n}{100000}$	$\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{10 \text{ Mhl.}}$	$\frac{n}{100 \text{ Mhl.}}$	aq.	mg/l: NaCl
NaCl:	$\frac{n}{10}$	—	—	—	±	3	3	3	4	5850.
	$\frac{n}{100}$	—	—	±	±	3	3	3	3	585.
	$\frac{n}{1000}$	—	—	±	1	±	3	3	3	58.5
	$\frac{n}{10000}$	—	—	±	±	1	3	—	—	5.85
	$\frac{n}{100000}$	—	—	±	±	2	3	3	1	0.585
	$\frac{n}{1000000}$	—	—	±	—	2	3	4	4	0.0585*)
	$\frac{n}{10000000}$	—	—	—	±	2	3	±	±	0.0058
	$\frac{n}{100000000}$	—	—	—	±	2	3	4	—	0.0006
aq.		—	—	±	±	±	1	1		(0.12 geschätzt!)
NaCl: pH 8.3	$\frac{n}{10}$	±	±	±	±	1	3	4	4	
	$\frac{n}{100}$	±	±	±	±	1	3	3	4	
	$\frac{n}{1000}$	±	±	—	±	±	4	3	±	
	$\frac{n}{10000}$	±	—	—	±	±	2	3	—	
	$\frac{n}{100000}$	±	—	—	±	±	2	3	4	
	$\frac{n}{1000000}$	±	—	—	±	±	3	3	±	
	$\frac{n}{10000000}$	±	—	—	—	±	1	4	±	
	$\frac{n}{100000000}$	±	—	—	—	±	—	2	4	
aq.		±	—	±	±	±	—	3		
CuCl <sub>2</sub> : mg/l		670.	67.	6.7	0.67	0.067	0.0067	0.00067		

\*) Entspricht etwa dem halben Werte der mit der Einsaat eingebrachten Kochsalzmenge!

Kombination mit Abnahme der Kochsalzkonzentration zu immer breiteren Wirkungszonen ausläßt. Sie übertrifft dabei in den höchsten Verdünnungen der Komponenten bei weitem die Wirkungsbreite der Kupferkontrollen (wenigstens gegen Staphylokokken). Diese Wirkungsbreite erweist sich nach den Kochsalzkontrollen als additive Verstärkung. Besonders charakteristisch tritt diese additive Verstärkung in den gepufferten Reihen hervor. Im Einzelnen ist dabei noch zu bemerken: das Auftreten zwei- und dreiphasiger Wirkungszonen besonders in den pufferfreien Kombinationen mit ausgesprochener Hemmung in den stärkeren Konzentrationen, und besonders in den gepufferten, schwach alkalischen Reihen; ferner zweiphasige, starke Wirkung der beiden Kochsalzreihen; und zweiphasige Wirkung der gepufferten Kupferkontrollen; schliesslich zunehmende Verstärkung der Kupferwirkung durch Kochsalz in den hohen und höchsten Verdünnungen, besonders in den gepufferten, schwach alkalischen Reihen u. zw. einerseits durch Ausweitung der ersten Wirkungsphase des Kupfers wie auch durch Begünstigung des Auftretens einer zweiten Wirkungsphase in den höchsten Kupferverdünnungen. Es handelt sich also bei zunehmender Dissoziation der komplexen Kupfer- und Kupferkochsalzverbindungen mit fallender Kochsalzkonzentration um zunehmend additive Wirkung beider Komponenten, besonders in schwach alkalischem Milieu: eine additive Wirkung kleiner und kleinster Mengen von Kupfer- und Natriumchlorid. Dabei ist besonders zu beachten, dass dem Kochsalzwerte  $n/1000000$  (entsprechend etwa 0.0585 mg/L) auch etwa die mit der Einsaat von 1/50 Öse Kultur eingebrachte Kochsalzmenge entspricht; dass mithin von dieser Reihe an die Wirkungsverschiebungen nicht mehr allein auf die fallenden Salzmengen, sondern auch auf die Elektrolyte und Colloide (Puffer) der eingesäten Kulturmengen bezogen werden müssen, welche die Dissoziation des Kupfers und neue Komplexbildung offenbar bedeutend fördern.

Gegen Paratyphusbazillen zeigt sich im ganzen das gleiche Bild.

### 3) Chlor und Kochsalz.

In *Versuch 76* ist die Kombination  $\text{Cl}_2 + \text{NaCl}$  in destilliertem Wasser und in m/60 Phosphatpufferlösung ( $p_{\text{H}}-8$ ) untersucht worden. Deutlich tritt dabei eine Verstärkung der Chlorwirkung durch kleine Kochsalzdosen hervor u. zw. in destilliertem Wasser zwischen n/1000 und n/1000000 NaCl. Daneben treten zweite Wirkungsphasen in Erscheinung, besonders in den Pufferreihen, in welchen sie sich mit fallenden Kochsalzmengen der ersten Phase nähern: Zweiphasige Wirkung des Chlors in alkalischer Pufferlösung und insonderheit der gepufferten Kochsalzkontrollen.

Wenn wir die zweiten Wirkungsphasen, welche in höheren und höchsten Verdünnungen von Giften und Kombinationen von solchen auftreten, als oligodynamisch bezeichnen (Hailer), worauf ich bei der Erörterung der vorliegenden Versuche und bei deren Ergebnissen noch zurückzukommen habe, so ist die oligodynamische Wirkung überall als eine Wirkung hoher und höchster Verdünnungen aus ihren Komplexverbindungen ionisierbarer, anorganischer oder organischer, chemischer Körper und deren Kombinationen aufzufassen. Nach Intervallen unwirksamer Konzentrationen treten oligodynamische Zonen (zweite, u. U. auch dritte Phase) auf u. zw. durch Aufhebung hemmender Komplexbildung, durch irreversible Fällung von Metallsalzen (z. B.  $\text{CuCl}(\text{OH})$ ), durch Veränderung der Plasmahaut infolge fällender Wirkung der Metallsalze, je nach deren Wertigkeit oder infolge von Quellung des Plasmas durch Wasserstoff- oder Hydroxytionen. Die Komplexbildung und die Dissoziation daraus ist offenbar noch in so minimalen Konzentrationen anorganischer und organischer Stoffe möglich (0.0585 mg/l NaCl) wie sie in kleinen Bruchteilen einer Öse (2 mg) Kultur (z. B. 1/50 Öse) oder in gekochtem, destilliertem Wasser (Glasalkalien und Erdalkalien, ausgelaugte Spuren von Kieselsäure, Aluminiumoxyd u. a.) u. dgl. enthalten sind.

Versuch 76.

Kombination von Kochsalz und Chlor in destilliertem Wasser und mit Phosphatpuffern bei pH 8.3 gegen  $\frac{1}{50}$  Öse Staphylokokken.

Aussaat nach 24 Stunden:

Cl <sub>2</sub> :	$\frac{n}{10000}$	$\frac{n}{100000}$	$\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{10000000}$	$\frac{n}{100000000}$	aq.	mg l
NaCl: $\frac{n}{10}$	—	2	3	3	3	3	5850.
$\frac{n}{100}$	—	2	2	2	2	3	585.
$\frac{n}{1000}$	—	±	3	2	2	3	58.5
$\frac{n}{10000}$	—	±	2	2	±	3	5.85
$\frac{n}{100000}$	—	±	2	2	3	3	0.585
$\frac{n}{1000000}$	—	±	1	2	3	4	0.0585*)
$\frac{n}{10000000}$	—	1	2	3	3	3	0.0058
$\frac{n}{100000000}$	—	1	2	3	3	3	0.0006
aq.	—	±	1	2	3	4	(0.12 geschätzt!)
NaCl: pH 8.3							
$\frac{n}{10}$	—	2	2	4	1	2	5850.
$\frac{n}{100}$	—	3	1	3	4	—	585.
$\frac{n}{1000}$	—	1	2	—	2	3	58.5
$\frac{n}{10000}$	—	2	2	2	2	2	5.85
$\frac{n}{100000}$	—	2	1	3	3	3	0.585
$\frac{n}{1000000}$	—	3	3	2	2	4	0.0585*)
$\frac{n}{10000000}$	—	—	3	3	3	1	0.0058
$\frac{n}{100000000}$	—	3	3	4	4	4	0.0006
aq.	—	4	3	2	1	4	
Cl <sub>2</sub> : mg/l:	3.55	0.355	0.0355	0.0035	0.0003		

\*) Entspricht etwa dem halben Werte der mit der Einsaat eingebrachten Kochsalzmenge!

## 4) Glaswirkung, Aluminium, Kiesel.

Zu dem eben genannten, zuerst von Botanikern beobachteten *Einflusse der Wand von Glasgefäßen auf das Wachstum niederer Pflanzen*, welcher dann auch von Ficker (3) zum Gegenstande von Versuchen an Bakterien gemacht wurde, teile ich hier nur einen Versuch mit, welcher im Kupferchloridversuch eine deutliche additive Wirkung gekochten, destillierten Wassers im Vergleich mit ungekochtem hervortreten lässt.

Staphylokokken und Paratyphusbazillen wurden in frisch destilliertem und im gleichen, aber gekochten Wasser der Wirkung von Kupfer vergleichsweise ausgesetzt. Dabei treten ausgesprochen zweiphasige Wirkungen auf, ausser in den gepufferten, alkalischen Reihen ( $p_H=8$ ) besonders in den Reihen mit gekochtem, destilliertem Wasser und mit ausgeprägter Hemmung in den höheren Kupferkonzentrationen. Die bedeutende Verstärkung der »reinen Wirkung des Kupfers« durch gekochtes destilliertes Wasser weist auf additive Wirkungen durch Alkalien und Erdalkalien u. a. hin.

Nach Allem, was wir über die Ablösung von Alkalien aus Glas (5; dort auch weitere Litt.), und aus den vorliegenden Versuchen über die Verstärkung des Kupfers durch Hydroxylionen wissen, könnte es sich um Alkalien wohl handeln, welche die Verstärkung des Kupfers in gekochtem Wasser verursachen. Aber auch Aluminium und Kiesel kommen in Betracht. F. Foerster berichtet über die Einwirkung der Lösungen von Alkalien und Salzen auf Glas (15), dass Lösungen kaustischer Alkalien viel stärker als Wasser auf Glas wirken, indem sie alle Bestandteile des Glases, d. h. auch Kieselsäure, Thonerde und Kalk, auflösen u. zw. am stärksten Natronlauge. Bei gewöhnlicher Temperatur wirken konzentrierte Lösungen schwächer als verdünntere auf Glas ein, besonders wenn letztere durch geringe Mengen Kieselsäure verunreinigt sind. Kohlensaure Alkalien greifen schon in sehr verdünnten Lösungen Glas sehr viel stärker an als Wasser u. zw. das Natriumsalz stärker als das Kaliumsalz. Die Wirkung der kohlensauren Alkalien kann gelegentlich sogar stärker sein als diejenige der kaustischen. So ist eigentlich nur

die Frage zu klären, ob die Ablösung von Kieselsäure, Thonerde und Kalk in ausreichender Menge durch die beim Kochen des Wassers ausgelaugten Alkalien erfolgt, oder erst mit der Einsaat der Bakterienkultur die genannten Stoffe eingeführt werden. Eingehende chemische Untersuchungen hierüber dürften ausserordentlich aufklärend sein für die Wirkungsweise kleinster Stoffmengen. Welche Bedeutung Aluminium und Kiesel für die Vergiftung von Keimen haben können, geht aus folgendem hervor.

Im Hinblick auf die Analyse der Bedingungen bei der Wasserreinigung habe ich ein m. W. in diesem Zusammenhange kaum beachtetes Kation wegen seiner stark eiweissfällenden Wirkung untersucht, nämlich das *Aluminium*.

Die Wirkungskurve des Aluminiumchlorids *in destilliertem Wasser und in gepufferten Lösungen steigender  $p_H$*  weist gegen Staphylokokken wie gegen Paratyphusbazillen *überall zweiphasige Wirkung* auf. Deutlich ist dabei entsprechend der hydrolytischen Spaltung und sauren Reaktion der Aluminiumsalze, in den konzentrierten Lösungen und auf der sauren Seite der  $p_H$  eine kräftige Wirkung festzustellen, während die *zweite Phase* erst in ausserordentlichen Verdünnungen auftritt und *nach der alkalischen Seite orientiert* erscheint.

Dieses erweisen auch Versuche, welche die Kombination  $AlCl_3 + NaCl$  bei mittleren Kochzalskonzentrationen ( $n/10000$  bis  $n/1000000$ ) und höchsten Aluminiumverdünnungen ( $n/10000000$  bis  $n/100000000$ ) mit breiten Wirkungszonen gegen Paratyphusbazillen darstellen. Es handelt sich sichtlich um additive Effekte  $Al + Na$ .

Von entsprechendem Interesse ist auch das Verhalten von Aluminiumchlorid und Kupferchlorid im Reihenversuch fallender Konzentrationen beider Komponenten gegen Staphylokokken und Paratyphusbazillen. In den höheren Aluminiumkonzentrationen macht sich überall gegen Kupfer noch starke Hemmung geltend u. zw. bis zu  $n/100000$   $CuCl_2$  und Grenzwerten zwischen  $n/1000000$  bis  $n/10000000$   $AlCl_3$ . Von da ab aber treten mehr oder weniger breite, additive Wirkungszonen auf, welche in der Kombination mit grosser Regelmässigkeit und an ziemlich gleicher Stelle gegen beide Keimarten einsetzen, aber auch bei den Komponenten allein sehr häufig in oligodynamischer Wirkung als zweite Phase in Erscheinung treten.

Nach neueren noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen wirkt das reine *Aluminiumoxyd* (zu  $n/17333$  in Wasser löslich) gegen Staphylokokken *absolut erst* in Verdünnungen von *über*  $n/1000000$ ; und ist seine absolute Wirkung auch bei  $n/1000000000$  noch nicht erschöpft. Durch Chlorionen wird es weitgehend gehemmt, durch Kieselsäure in Konzentrationen von  $n/1000000$  bis  $n/100000000$  noch verstärkt.

*Kieselsäure* wirkt in schwach alkalischer Lösung ähnlich wie  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Auch ihre Wirkung beginnt erst mit etwa  $n/1000000$  und wirkt noch stark bis über  $n/100000000$ . Auch *Kieselsäure* wird durch Chlorionen stark gehemmt. Bei den Verdünnungen, welche hier in Frage kommen, haben die Säure- oder Alkalimengen an sich für die bakterizide Wirkung keine Bedeutung mehr.

*Diese Erkenntnis einer kombinierten Wirkung kleinster Mengen von Metallsalzen, Halogenen, Kiesel u. a.* scheint mir für eine methodische Erweiterung unserer Vorstellungen vom *Mechanismus der Desinfektion* ebenso wichtig wie für die praktischen Forderungen, welche bei einer Prüfung von Desinfektionsmitteln zu berücksichtigen sind.

Das Wesen der *oligodynamischen Wirkung* ist darnach in zweifacher Hinsicht zu erweitern:

1) *Die Oligodynamie gründet sich auf eine Wirkung von Metallsalzen bzw. von Metallionen*, welche unter dem Angriffe im Wasser gelöster Gase und anderer von den Gefäßswänden abgelöster Stoffe auf Metalle oder deren Salze in mehr oder weniger unlösliche Verbindungen übergeführt (Komplexbildung) und welche von den Zellen besonders leicht aufgenommen werden (Adsorption). Schon in ihren klassischen Phänomenen wird so die Oligodynamie durch die Lösung von Kupfer in Verbindung mit Alkalien, Erdalkalien, Silikaten, Aluminaten u. a. m. — je nach der Art der benutzten Destilliergefäße, Glas-, Steingut-, Steinzeug- oder gemauerten Behälter oder nach der Herkunft des Wassers —, weiterhin aber in den technischen Bereichen ihres Vorkommens (Desinfektion) einschl. der bakteriologischen Technik *als eine Kombinationswirkung im gegebenen Milieu* und bei gegebener ( $\text{H}^+$ )

höchst wirksamer chemischer Körper, mithin als ein äusserst verwickelter Prozess vorgestellt werden müssen. Daraus ergibt sich, das

2) die *oligodynamische Wirkung nicht auf Metalle beschränkt* ist. Auch die Halogene weisen die wesentlichen Merkmale der Oligodynamie auf. Diese kommen aber auch noch vielen anderen chemischen Stoffen zu wie etwa Aluminium und Kiesel, ferner organischen Verbindungen der Pyridin- und Chinolinreihe, auf welche ich a. a. O. näher eingehe (16).

Mit einer kurzen Betrachtung möchte ich noch auf die quantitative Seite der Wirkungsbeziehungen zwischen den bei den mitgeteilten Versuchen angewendeten chemischen Körpern und den Zellen eingehen, d. h. die *Gewichtsmengen der Mittel, welche zur Anwendung kamen, in Beziehung zum Desinfektionsobjekt* und dessen Gewichtsmengen setzen. Die in den Versuchen zur Verwendung gekommenen Bakterien- oder Sporenmengen von 1/10—1/100 Normalöse betragen einschliesslich der unvermeidlich anhaftenden Nährbodensubstanzen vorwiegend organischer Natur etwa 0.2—0.02 mg feuchter bzw. 0.02—0.002 mg trockener Substanz in jedem Versuchsröhrchen zu 2 cm<sup>3</sup> wässrigen Lösungsmittels. Einer 1/10 Normalöse würde dabei ein Kochsalzgehalt entsprechen, welcher der Versuchslösung 0.0012 mg NaCl zuführt, was einer Konzentration von 0.6 mg/l oder n/100000 NaCl entspricht. Von welcher Bedeutung das für die Oligodynamie sein kann, habe ich oben mehrfach dargelegt (siehe bes. Versuch 74!). Diesen Gewichtsmengen eines Gemenges von Suspensions- und Emulsionskolloiden in wässriger Salzlösung entsprechen nun an Mittelwerten in Wirksamkeit tretender Substanzen: (siehe Tabelle auf S. 128).

Diese Reaktion kann aber bei weitem nicht als quantitative, primär stöchiometrische Umsetzung der hier grob modellmässig vorausgesetzten und berechneten Mengen verstanden werden. Vielmehr treten die gedachten chemischen Körper zunächst mit der Plasmahaut d. h. vorerst nur der Grenzschicht der Keime in Verbindung, wodurch sich die quantitativen Verhältnisse ausserordentlich zugunsten der an die Keime herangebrachten Stoffe ändern, welche in dem verwickelten biologischen Milieu der Grenzflächen quellend oder entquellend und fällend wirken und damit sich selbst oder andern Ionen Zutritt öffnen oder wehren können. Es erübrigt sich, hier über den Hinweis auf diese qualitativen und quantitativen Wirkungsbeziehungen noch weiter auf die Wechselbeziehungen zwischen den genannten chemischen und biologischen Körpern einzugehen.



Stoffart:	Konzentration	mg/l	Absolute Mengen: mg/2 cm <sup>3</sup> :
Bakterientrockensubstanz		10—1	0.02—0.002 (geschätzt)
Darin enth.			
Kochsalz	n/100000— 1/1000000	0.6—0.06	0.0012—0.00012
NaCl	n/10000	5.85	0.0117
CuCl <sub>2</sub>	n/1000000	0.067 (0.032 Cu)	0.000134
Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	n/10000000	0.016 (0.011 Ag)	0.000032
AlCl <sub>3</sub>	n/1000000000	0.0000445 (0.000009 Al)	0.000000089
SiO <sub>2</sub>	n/10000000	0.0015 (0.0007)	0.0000014
I <sub>2</sub>	n/100000	1.27	0.00254
Cl <sub>2</sub>	n/100000	0.355	0.00071
»	n/10000000	0.003	0.000007
Phosphate	m/60	2500.	5.

Aus den mitgeteilten Versuchen und den daraus gezogenen Schlüssen ergibt sich aber auch, dass *von einer reinen Wirkung von Desinfektionsmitteln in Wasser im strengen Sinne nicht gesprochen werden kann*; denn die mit den Testkeimen und den Nährbodenresten in den Versuch eingeführten organischen und anorganischen Stoffe bieten an sich schon eine Fülle von Fehlerquellen, welche mit Rücksicht auf die praktischen Gegebenheiten eines in Frage stehenden Wirkungsmilieus zu würdigen gerade Aufgabe einer Desinfektionsmittelprüfung ist. So können Komplex- und Selbstkomplexbildung im Versuche über die reine Wirkung völlige Wirkungslosigkeit vortäuschen, während im gegebenen Milieu alle Voraussetzungen zu absoluter Wirkung vorhanden sein und durch genauere Analyse der Wirkungsbedingungen wohl vorher aufgeklärt werden können.

Es darf in diesem Zusammenhange vielleicht auch auf *biologische Abwehrphänomene* hingewiesen werden, welche offenbar auf verwandten Mechanismen beruhen. Besonders in cytolytischen und bakteriziden Glasversuchen treten phasenhafte Verläufe mit wiederholten Wirkungszonen u. zw. noch in ausserordentlich hohen Ver-

dünnungen wirksamer Sera zutage. Auch hier treten paradoxe Phänomene in Erscheinung, wenn z. B. bei Verminderung der Komplementmenge unter sonst gleichen Verhältnissen eine *mächtige Steigerung der Bakterizidie* eintritt. Es dürfte nach meinen Versuchen kaum ein Zweifel bestehen, dass auch hier *die Serumsalze und -puffer neben der physiologischen Kochsalzlösung eine entscheidende Wirkung entfalten*. Dass Neutralsalze u. zw. noch in sehr geringen Konzentrationen, Halogene, Schwermetalle, Aluminium, Kiesel, organische Körper und deren Kombinationen das Wirkungsphänomen der Mehrphasigkeit darbieten, weist nicht nur auf die Bedeutung der kleinen und kleinsten Mengen reagierender Körper im Bereiche der Zellvergiftung, sondern auch darauf hin, welche Bedeutung die Elektrolyte im physiologischen und im pathologisch veränderten (sensibilisierten) Milieu für die Abwehr von Infekten und Giften haben.

### *Ergebnisse.*

1) Die Metalle Kupfer und Silber zeigen in den geprüften Salzen zweiphasige Wirkung.

2) Die geprüften Halogene Jod und Chlor weisen ebenfalls häufig zweiphasige Wirkung auf.

3) Die Kombination der Metalle Kupfer und Silber mit den Halogenen Jod und Chlor bietet diese zweiphasige Wirkung mit grosser Regelmässigkeit dar. Die enge zweite Phase wird dabei durch geringe Abnahme der ( $H\cdot$ ) mächtig verbreitert.

4) Kochsalz in fallender Konzentration verstärkt additiv die Metalle Kupfer und Silber, auch bei Gegenwart von Halogenen u. zw. besonders bei abnehmender ( $H\cdot$ ).

5) Entsprechende Modellversuche in destilliertem Wasser und in Rohwasser und Filtraten aus dem Mälarsee und ähnlichen lassen annehmen, dass Chlorung und Chlorkupferung (-Silberung) im Effekte wesentlich von der Menge des Chloridchlor und von zwei- und mehrwertigen Metallsalzen (Al), weiter von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig sind. Verminderung des Chloridchlor und des Aluminiumchlorid sowie Abnahme der ( $H\cdot$ ) wirken im Modellversuch verstärkend auf Chlor, auf Kupfer und deren Kombination.

6) Dabei weisen die Testobjekte spezifische Empfindlichkeit auf: Staphylokokken sind gegen die Kombination Chlor + Kochsalz bzw. Chlor + Kochsalz + Kupfer, weiterhin gegen Aluminium bedeutend empfindlicher als Paratyphusbazillen, letztere dagegen empfindlicher gegen die Kombination Kupferchlorid + Aluminiumchlorid als die ersteren. Subtilissporen sind relativ wenig empfindlich gegen Kupferzusatz bei Chlorung, wohl aber gegen destilliertes Wasser. Diese Wirkung ist wahrscheinlich als Neutralsalz-Alkali-Wirkung aufzufassen.

7) Eine genauere Prüfung der antagonistischen Wirkung von Kupferchlorid und Chlor (Silbersulfat und Chlor), insbesondere aber von Kupferchlorid und Kochsalz bestätigt diesen Antagonismus. Darüber hinaus aber zeigen sich in Reihenversuchen phasenhafte, synergistische Effekte, welche als additive Wirkungen gedeutet werden müssen, und in welchen neben den genannten chemischen Körpern bzw. deren Dissoziationsprodukten offenbar mit der Einsaat eingebrachte Elektrolyte und Kolloide durch ihre Salz- und Pufferwirkung, besonders in der zweiten Wirkungsphase der Komponenten, sich geltend machen.

8) Ähnliche, wenn auch weniger markante Effekte weist auch die Kombination Chlor + Kochsalz auf. Dieselben sind als oligodynamische Effekte anzusehen und haben additiven Charakter.

9) Wesentliche Wirkungsmomente sind bei den höchsten eben noch wirksamen Verdünnungen von Desinfektionsmitteln an chemische Körper geknüpft, welche mit den Testobjekten aus den Kulturmedien in den »reinen« Versuch in destilliertem Wasser eingeführt werden. Es handelt sich dabei um Elektrolyte und Kolloide, welche auf die Dissoziation komplexer Verbindungen und auf neue Komplexbildung der Komponenten und damit auf deren Wirkung von ausschlaggebendem Einflusse sein müssen.

10) Die Bedeutung des Glases und ähnlicher keramischer Stoffe für die Komplexbildung und die Dissoziation wirksamer Ionen ist insbesondere für die zwei- und mehrwertigen (z. B.

für die Wasserdesinfektion) in Frage kommenden chemischen Körper, vor allem die Metalle (z. B. Aluminium), aufzuklären und weiterhin als Fehlerquelle »reiner« Versuche abzugrenzen.

11) Aluminiumchlorid ist in konzentrierter Lösung, entsprechend dem schwach basischen Charakter des Al, bei saurer Reaktion begrenzt wirksam, entfaltet dagegen in höchsten Verdünnungen bei schwach alkalischer Reaktion (und entsprechend 0.009—0.00009 mg/l) noch eine zweite, oligodynamische Wirkungsphase, welche durch Kochsalz oder Kupferchlorid, besonders bei schwach alkalischer Reaktion ( $p_H$ -8), additiv mächtig verstärkt wird.

12) Die *oligodynamische Wirkung* gründet sich auf die *Kombination an sich oft kaum oder gar nicht mehr wirksamer Komponenten bei günstiger Wasserstoffionenkonzentration*, wobei das »wirksame« Mittel nicht wichtiger ist als »indifferente« Neutralsalze oder deren Ionen (Komplexbildung) oder die ( $H^+$ ) als Regulator der Dissoziation komplexer Verbindungen bzw. in ihrem Einflusse auf den Quellungszustand der Plasmahaut des Testobjekts oder schliesslich das Testobjekt selbst in seiner biologischen Konstitution und Condition. *Neben den Metallen sind Neutralsalze, Halogene, Silicium und zahlreiche andere chemische Körper, besonders der organischen Reihe, analog wirksam.*

13) Die oligodynamische Reaktion und biologische Abwehrmechanismen sind in ihrem Chemismus nahe verwandte Prozesse.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, allen Herren, deren Unterstützung ich bei meiner Arbeit habe erfahren dürfen, hier für ihre Freundlichkeit zu danken: vor Allen Professor C. Naeslund, dessen unverändertem Wohlwollen ich die Arbeitsmöglichkeit im Institute verdanke, Docent G. Nordgren für sein stetes Entgegenkommen, Docent G. Olin vom Staatlichen Seruminstitut für Überlassung von Kulturmateriel, Ingenieur Westberg und Kandidat Tullström vom Stockholmer Wasserwerk und Herrn Nylander im Sportpalast für Überlassung von Wasserproben und Analysen.

## LITTERATUR:

- 1) *C. von Naegeli*: Neue Denkschriften d. allgem. Schweizerischen Ges. f. d. ges. Naturwissenschaft 33, 1893.
- 2) *O. Israel u. Th. Klingmann*: Virschows Archiv 147, 293, 1897.
- 3) *M. Ficker*: Zeitschrift f. Hygiene u. Inf. 29. 1, 1898.
- 4) *von Linden*: Zentralblatt f. Bakteriologie, Orig. 87, 1921.
- 5) *F. Mylius u. F. Foerster*: z. f. analyt. Chemie XXXI, 241, 1892.  
*F. Foerster*, ebenda XXXIII, 381, 1894.
- 6) *R. Abegg*: Zeitschrift f. Elektrochemie X, 77, 1904.
- 7) — Sammlung chem. u. chem.-techn. Vorträge VIII, 147, 1903.
- 8) *V. Kohlschütter*: Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. zu Berlin 37, 1153, 1904.
- 9) *K. Spiro*: Münchener Med. Woch. S. 1601, 1915.
- 10) — Biochem. Zeitschrift 74, 265, 1916.
- 11) *E. Hailer*: Weyls Handbuch d. Hygiene VIII, 916, 1922.
- 12) *O. Ornstein*: Act. Path. et Microbiolog. Scand. XVII, 286, 1940.
- 13) *H. Kroó u. F. O. Schulze*: Deutsche Med. Woch. Nr. 42, 1927.
- 14) *O. Ornstein*: Zeitschrift f. Hygiene u. Inf. 106, 327, 1926.
- 15) *F. Foerster*: Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. zu Berlin 25, 2494, 1892.
- 16) *O. Ornstein*: Act. Path. et Microbiolog. Scand. (im Druck).

Abgeschlossen: Stockholm, den 13. Juni 1941.

Für den Druck fertiggestellt: 15. Juli 1942.

Barnhusgatan 4, IV.

## TUBERKULOSEPROPHYLAXE UND -THERAPIE IN EXPERIMENTELLER BELEUCHTUNG MITTEILUNG I.

Von K. A. Jensen und Inger Kiær.

(Vorgetragen von K. A. Jensen in der Med. Gesellschaft am 5.5.1942).

(Eingegangen bei der Redaktion am 30. September 1942).

Wenn wir heute abend über sowohl Prophylaxe als auch Therapie der Tuberkulose sprechen und uns nicht nur mit einem dieser beiden Probleme begnügen wollen, so liegt das daran, dass der enge Zusammenhang dieser Fragen einem sehr schnell klar wird, sobald man auf experimentellem Wege zu erforschen versucht, ob z. B. eine Impfung oder eine Behandlungsmethode günstig auf den Verlauf der Tuberkulose einwirkt. Daher kommt es auch in erster Linie darauf an, dass man die biologischen Hauptgesetze, welche für die Tuberkuloseentwicklung gelten, sowie die zahlreichen verschiedenen ihren Verlauf beeinflussenden Faktoren kennt.

Die Untersuchungen, die zuerst hier behandelt werden sollen, gehen daher auch darauf aus, den Verlauf der experimentellen Tuberkulose bei teils nicht-allergischen,<sup>\*)</sup> teils allergischen Meerschweinchen zu beleuchten.

---

<sup>\*)</sup> In dieser Arbeit wird v. Pirquet's Definition des Begriffes Allergie angewandt. Unter Allergie versteht man danach »eine veränderte Reaktionsfähigkeit«, welche Bezeichnung deshalb sowohl die Überempfindlichkeit als auch die übrigen Immunitätsfaktoren umfasst. Viele Autoren haben andere untereinander nichtübereinstimmende Definitionen angewandt, wodurch einige Verwirrung entstanden ist. Im übrigen kann auf eine frühere mehr ausführliche Besprechung dieser Verhältnisse verwiesen werden.<sup>1)2)</sup>

In den meisten Arbeiten über die experimentelle Tuberkulose und den Einfluss, den die Allergie auf ihren Verlauf ausübt, wird *Koch's* Phänomen angeführt, welches daher hier kurz besprochen werden mag. Wenn man nicht-allergische Meerschweinchen mit z. B. 1/100 mg eines mittelvirulenten Tuberkelbazillenstammes subkutan infiziert, wird in ca. den ersten 8 Tagen nichts an der Impfstelle zu sehen sein. Danach bildet sich ein kleines Knötchen, das schnell an Grösse zunimmt. Es entsteht ein Abszess, welcher perforiert und ein Geschwür hinterlässt, das oft bis zum Tode des Tieres an generalisierter Tuberkulose bestehenbleibt. Ungefähr gleichzeitig mit dem Entstehen des lokalen Prozesses beginnt die regionäre Lymphdrüse an Grösse zuzunehmen, und sie wird bald so gross wie ein Nusskern oder eine Nuss.

Falls man den gleichen Versuch bei einem Meerschweinchen anstellt, das infolge einer früheren Impfung oder einer tuberkulösen Infektion allergisch geworden ist, kann man ein ganz anderes Bild beobachten. Bereits 12—24 Stunden nach der subkutanen Einspritzung entsteht lokal eine kräftige Entzündung mit Oedem und Hyperämie. Je nach der Intensität der Allergie, der Grösse der Bazillendosis und der Virulenz der Bakterien kann sich der lokale Prozess in verschiedener Weise entwickeln. Bei einer grossen Infektionsdosis und starker Allergie kann es zu Nekrose kommen (*Koch's* Phänomen). Bei einer kleineren Infektionsdosis kann die augenblickliche Entzündungsreaktion so minimal sein, dass sie sich nicht makroskopisch wahrnehmen lässt; erst nach Verlauf einiger Tage zeigt sich ein kleines Knötchen, welches nach einer gewissen Zeit wieder verschwinden kann. Die regionäre Lymphdrüse wurde in *Koch's* klassischem Versuch nicht vergrössert; doch wird in der Regel die Infektion sich auch hierhin ausbreiten, wenn auch beträchtlich langsamer als bei dem Kontrolltiere. Das besagt, dass die Tuberkelbazillen bei dem allergischen Tier erheblich länger lokal fixiert werden als bei dem nicht-allergischen. Das gleiche gilt auch für die hämatogene Ausstreuung.

Nun muss fernerlich zugegeben werden, dass die subkutane Form der Infektion, bei der man in ein begrenztes Gebiet eine recht grosse Menge Tuberkelbazillen einführt, erheblich von der natürlichen Infektion abweicht, bei welcher das Individuum nur eine einzige oder ganz wenige Tuberkelbazillen einatmet. Für eine gröbere Orientierung sind solche Versuche ausreichend; dagegen nicht, wenn man genauere Aufschlüsse über den Verlauf der Tuberkulose haben und den Einfluss der verschiedenen Faktoren untersuchen will.

Bei der Ausführung derartiger Versuche haben wir eine andere Versuchstechnik gewählt, die darin besteht, dass wir das Versuchstier eine so fein versprühte Suspension von Tuberkelbazillen einatmen

lassen, dass jedes Tröpfchen nur eine einzige oder höchstens einzelne Bazillen enthält. Diese feinen Tröpfchen vermögen ganz tief bis in die Alveolen hineinzudringen, und wir wissen dann, dass jeder einzige Prozess, der entsteht, ebenso wie bei der natürlichen Infektion, von einer einzigen oder ganz vereinzelt Tuberkelbazillen ausgeht.

Die infizierten Tiere werden mit verschiedenen langen Zwischenräumen getötet und die makroskopisch sichtbaren Prozesse beobachtet. Ausserdem wird eine histologische Untersuchung der Lungen und Bronchialdrüsen an sowohl mit Zellenfärbung als auch mit Tuberkelbazillenfärbung behandelten Präparaten vorgenommen, um hierdurch zu einer genaueren Kenntnis der Wechselwirkung zwischen dem Organismus und den Tuberkelbazillen zu kommen.

Die genauere Technik ist in früheren Arbeiten, auf die hier verwiesen sei, beschrieben worden.<sup>3)4)</sup>

Schliesslich wird eine quantitative Aussaat aus Lungen und Milz vorgenommen, um Klarheit über den Gehalt dieser Organe an wachstumsfähigen Tuberkelbazillen zu erhalten.

Diese Aussaat geht in folgender Weise vor sich:

Die eine Hälfte der Lungen wird gründlich feinzerteilt, und eine bestimmte Gewichtsmenge dieses Lungenbreies wird mit 4 % NaOH  $\frac{1}{2}$  Stunde lang homogenisiert. Nach kräftigem Zentrifugieren wird der Bodensatz mit einem oder zwei Tropfen 8 %iger HCl neutralisiert und sorgfältig in 1 ccm Salzlösung aufgeschwemmt. 4 Löwengläser<sup>5)</sup> werden mit je 0,1 ccm beimpft. Die Gläser werden so gestellt, dass die Nährbodenoberfläche wagrecht steht, bis die ausgesäte Flüssigkeit eingetrocknet ist. Darauf wird der Pfropfen mit Paraffin dicht verschlossen, und die Gläser kommen bis zu 2 Monate in den Brutschrank. Die Zahl der Kolonien wird bestimmt und die Mittelzahl des Wachstums für die 4 Gläser berechnet. Diese Zahl ist in den Tabellen angeführt. Ausserdem wird der Bodensatz wie 1 + 9 (0,5 ccm Aufschwemmung in physiologischer Salzlösung + 4,5 ccm Salzlösung) verdünnt und hiervon 4 Gläser mit je 0,1 ccm in der gleichen Weise beimpft. Je nach der Entwicklung der Tuberkulose sind folgende Verdünnungen zubereitet worden: unverdünnt —  $10^{-1}$  —  $10^{-2}$  —  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$ ; wenn nämlich mehr als ca. 100 Kolonien pr. Glas vorhanden sind, kommt es zu einem zusammenfliessenden Wachstum, das eine Bestimmung ihrer Anzahl unmöglich macht.

In Fig. 1 sind die histologischen Beobachtungen bei einem solchen Inhalationsversuche rein schematisch wiedergegeben (s. auch Tabelle 1). Die einzelnen eingeatmeten Tuberkelbazillen werden von grossen Makrophagen aufgenommen. Nach



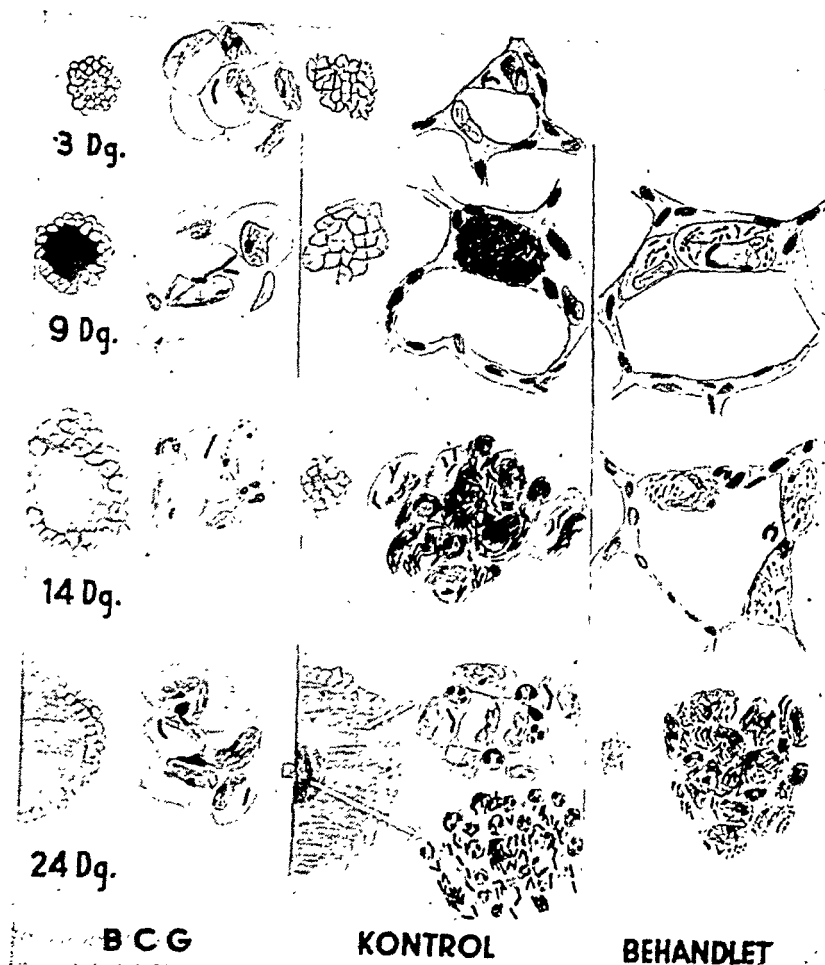


Fig. 1.

einer Latenzzeit, die von der Virulenz der Bakterien abhängig ist, beginnen sie sich zu teilen. So kann man z. B. bei dem 3 Tage nach der Infektion seziierten Tiere einen Makrophagen finden, der ohne jegliche Entzündungsreaktion 2—3 Tuberkelbazillen enthält. S. Fig. 1 — die kleine Zeichnung links zeigt das Lungengewebe bei schwacher Vergrößerung, während die grosse Zeichnung einen kleinen Ausschnitt dieses Lungengewebes mit der Immersionslinse gesehen wiedergibt. Wenn 9

Tage vergangen sind, wird man noch immer keine Entzündungsreaktion wahrnehmen können, während die Tuberkelbazillen sich vom 3. bis 9. Tage in einem solchen Grade vermehrt haben, dass sich innerhalb der Zelle unzählige von ihnen vorfinden.

Tabelle 4.

Getötet Tag	Behandlung	Lunge					Milz		
		unv.	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{10,000}$	unv.	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$
12	Kontrolle	$\infty$	32	3,3	0	0	3,8		
	B C G	10	1,6	0	0	0	0		
17	Kontrolle		$\infty$	60	5,3	1	14	3,3	0,3
	B C G		3	0,7	0	0	0,3	0	0
21	Kontrolle		$\infty$	ca.100	8,3	0	$\infty$	ca.100	8
	B C G		5	0,3	0	0	0	0	0
24	Kontrolle		$\infty$	82	7,3	0	$\infty$	55	5,7
	B C G		6	1,5	0	0	0	0	0
36	Kontrolle		$\infty$	35	4	0,5	$\infty$	25	4
	Kontrolle		55	7	1	0	10	1,3	0
	B C G		1	0	0	0	0,3	0	0
	B C G		3	0,3	0	0	0	0	0

Am 14. Tage ist die Allergie eingetreten. Um den tuberkelbazillenhaltigen Makrophagen herum, welcher oft nekrotisiert ist, sodass die Zelle geradezu gesprengt ist und die Tuberkelbazillen freigelassen hat, kommt es zu einer akuten exsudativen Entzündung mit Hyperämie, Exsudation und Emigration. Die entstandene Zellreaktion setzt sich hauptsächlich aus grossen mononukleären Zellen zusammen; doch sieht man zentral auch eine Anzahl Leukozyten. Die zahlreichen aus dem gesprengten Makrophagen freiwerdenden Tuberkelbazillen werden so gut wie ausschliesslich von anderen Makrophagen

aufgenommen, sodass einige von diesen unzählige, andere recht wenige Bazillen enthalten.

Es ist also das geschehen, dass die Allergie eingetreten ist, und *infolge der grossen Menge von Tuberkelbazillen* entsteht ein Koch'sches Phänomen, so wie man es wahrnimmt, wenn man ine grosse Bazillenmenge in ein im voraus allergisches Tier einspritzt, — d. h. eine kräftige exsudative Entzündung, Neigung zur Abszessbildung und Nekrose. Diese kräftige Reaktion rührt davon her, dass der Organismus gegenüber den Giftstoffen des Tuberkelbazillus überempfindlich geworden ist. Gleichzeitig geht eine kräftige Zerstörung der Tuberkelbazillen vor sich, ihre Vermehrung lässt nach und hört schliesslich so gut wie gänzlich auf.

Wir sehen nun auch, dass die Prozesse sich mit rasender Fahrt entwickeln. S. die Figur. Vom 14. bis zum 24. Tage ist ein grosser Knoten mit zentraler Abszessbildung, umgeben von epitheloiden Zellen und einer Anzahl Leukozyten, entstanden. Innen in dem Abszess sieht man ausgesprochene Nekrose, und wir finden dort zahlreiche Tuberkelbazillen, welche hier ausserhalb des reaktionsfähigen Lungengewebes gelagert sind und sich daher fortgesetzt vermehren können. Ausserhalb des Abszesses, in der epitheloiden Zellschicht, kann man wahrnehmen, dass die Tuberkelbazillen verstreut und einzeln intrazellulär liegen, sowie dass die Vermehrung fast ganz aufgehört hat.

Im Experiment, in dem man, um die einzelnen Tuberkelbazillen am 3. Tage finden zu können, die Tiere zahlreiche Tuberkelbazillen einatmen lassen muss, bilden die Bronchialdrüsen ein Spiegelbild der Vorgänge in der Lunge. Die Tuberkelbazillen gelangen recht schnell nach der Inhalation auf dem Lymphwege zu den Bronchialdrüsen. Die Allergie ist zu diesem Zeitpunkte noch nicht eingetreten, und sie können sich deshalb in derselben Weise wie in der Lunge vermehren. Zugleich mit dem Eintreten der Allergie kommt es zu der hämatogenen Ausstreuung. Da der Organismus jetzt allergisch geworden ist, verhalten sich die dadurch entstandenen sekundären Prozesse ungefähr wie die Infektion bei einem geimpf-

ten Tiere, d. h. es kommt zu keiner nennenswerten Vermehrung der Tuberkelbazillen, und es tritt augenblicklich eine kräftige Entzündungsreaktion ohne grössere Neigung zur Abszessbildung oder Nekrose auf.

### *Der weitere Verlauf der Tuberkulose.*

Es kann entweder eine akute miliare Tuberkulose entstehen, wenn der Tuberkelbazillus besonders virulent gewesen ist, oder eine chronische Lungentuberkulose. Die letztere kann sich in zwei Formen äussern:

1) In reaktionsfähigem Lungengewebe haben die Tuberkelbazillen, wie erwähnt, keine nennenswerten Vermehrungsmöglichkeiten, wohingegen sie sich in Alveolen, Bronchien, Abszessen und Kavernen, d. h. Stellen mit einer weniger ausgesprochenen Abwehrreaktion des Organismus, auch weiterhin vermehren können. An diesen Stellen finden sich daher zahlreiche Tuberkelbazillen. Wir wissen das von der Menschentuberkulose. Im Auswurf gibt es Unmengen von Tuberkelbazillen, während man in Lungenschnitten ausserhalb von Kavernen und Bronchien nur ganz vereinzelt findet. Die grossen Klumpen von Tuberkelbazillen in Kavernen und Alveolen können durch Hustenstösse in benachbarte gesunde Alveolen aspiriert werden. Hier haben wir also wiederum eine grosse Bazillendosis, die auf Lungengewebe trifft, welches gegen die Giftstoffe des Tuberkelbazillus überempfindlich ist. Als Folge davon kommt es zu einer neuen Gewebsschädigung, eventuell einer Nekrose wie bei *Koch's* Phänomen und damit der Möglichkeit neuer Kavernenbildung.

Die Ausbreitung geschieht also sozusagen mittelst einer *endogenen Inhalation*.

2) Man kann oft beobachten, dass dort, wo es zu keiner Nekrose gekommen ist, die vereinzelt und verstreut liegenden Tuberkelbazillen bewirken, dass die eine Schicht epitheloider Zellen auf die andere gefügt wird. Es bildet sich eine chronische produktive Tuberkulose mit Neigung zu fi-

bröser Umbildung, wobei die Ausbreitung hauptsächlich interstitiell vor sich geht.

In ihrem weiteren Verlauf kann die chronische Lungentuberkulose entweder ausheilen oder progrediiieren, sodass das Tier an seiner Infektion eingeht. In letzterem Falle beobachtet man, dass die Tuberkelbazillen sich von neuem intrazellulär zu vermehren beginnen wie zu Anfang der Tuberkulose, bevor die Allergie eintritt. Die Zellreaktion nimmt ab, und die Infektion geht in die kachektische Phase über.

Biologisch können wir mit 3 Phasen in der Tuberkuloseentwicklung rechnen:

1) *Der präallergischen Phase* (Wachstum der T. B. intrazellulär, ohne Entzündungsreaktion). 2) *Der allergischen Phase* mit Überempfindlichkeit und Immunität von steigender Intensität (kräftige Hemmung des Bakterienwachstums in reaktionsfähigem Lungengewebe). 3) *Der kachektischen Phase*.

Auf dem Übergang zwischen der präallergischen und der allergischen Phase gibt es viele Tuberkelbazillen und eine grosse Giftmenge. Daher entstehen akute exsudative Veränderungen, eventuell Nekrose, lymphogene und hämatogene Ausbreitung. Späterhin, nach der akuten Tötung der Bakterien, sind nur wenige Tuberkelbazillen (kleine Giftdosis) vorhanden, und wir gleiten daher nach und nach in die mehr chronische produktive Form über. Dieser Übergang zwischen der präallergischen und allergischen Phase erinnert an *Ranke's* sekundäre Phase mit Überempfindlichkeit ohne Immunität (die Tuberkulose benutzt alle Wege zu ihrer Ausbreitung).

Existiert denn eine solche Periode mit Überempfindlichkeit ohne Immunität, eine sogenannte negative Phase? Unsere Beobachtungen, über die weiter unten ausführlich berichtet werden wird, zeigen, dass sie nicht vorkommt.

Die Hauptursache der akuten exsudativen Entzündung zu Beginn der Tuberkulose ist die grosse Bakterienmenge. Wir finden deshalb auch, dass die Einbringung einer grossen Bakterienmenge in ein Tier mit einer seit langem bestehenden, chronischen Tuberkulose eine akute ex-

sudative Entzündung in der Form von *Koch's* Phänomen bewirkt, und nicht etwa eine chronische proliferative Entzündung.

Wir haben nun in den Hauptzügen gesehen, wie sich die Tuberkulose bei einem nicht-allergischen Meerschweinchen entwickelt, wie die Allergie entsteht, und welche Wirkung dieselbe hat.

Um darüber Klarheit zu bekommen, welche Bedeutung die Immunität hat, wenn sie von Anfang an zur Stelle ist, haben wir eine Anzahl Meerschweinchen mit Calmettevakzine geimpft; dann wurden dieselben, wenn sie eine kräftige positive Tuberkulinreaktion bekommen hatten, zusammen mit einer entsprechenden Anzahl von nicht-geimpften Meerschweinchen durch Inhalation in der vorher besprochenen Art infiziert. Mit verschiedenen Zeitabständen wurden die Tiere getötet und auf die beschriebene Weise untersucht. Das Ergebnis der histologischen Untersuchung ist in Fig. 1 skizziert.

Der Hauptunterschied zwischen der Entwicklung der Tuberkulose bei dem allergischen und dem nicht-allergischen Meerschweinchen besteht darin, dass die Allergie bei dem ersteren schon wirkt, während noch nur ein einziger Tuberkelbazillus vorhanden ist. Daher entsteht bereits am 1. Tage eine Entzündung; aber auf Grund der geringen Toxinmenge kommt es zu keinem Abszess und keiner Nekrose und die Entzündung geht schnell in die chronische produktive Form über. Es gibt auch keine nennenswerte Vermehrung der Tuberkelbazillen. Die lymphogene und hämatogene Ausbreitung tritt spät ein, ist von geringem Grade und ganz kurzer Dauer. Im Gegensatz hierzu tritt die Allergie bei den nicht-geimpften Meerschweinchen zu einem so späten Zeitpunkte auf und die eingeatmeten Tuberkelbazillen haben sich zu einer grossen Menge mit den bereits früher geschilderten Folgen vermehrt (Fig. 1 u. Tabelle 1).

Zur Ergänzung der schematischen Wiedergabe in Fig. 1 haben wir in Fig. 2 einige Mikrophotographien einer solchen Untersuchungsreihe abgebildet, die die Entwicklung der Prozesse zeigen. Im übrigen sei auf die bereits vorher erwähnten

Arbeiten<sup>3)4)</sup> verwiesen, in denen eine ähnliche Versuchsreihe vorliegt.

Ausserdem ist in Tabelle 1 das Ergebnis der quantitativen Aussaat aus Lungen und Milz wiedergegeben, welches einen auffallenden Unterschied in der Zahl der Tuberkelbazillen bei den geimpften und nicht-geimpften Meerschweinchen zeigt. Das gilt nicht nur von den primären Lungenprozessen, sondern auch, und dies in besonders hohem Grade, von den sekundären, woraus sich ergibt, dass die hämatogene Ausbreitung nur ganz gering und von kurzer Dauer ist.

Dieser Versuch, der nur ein einziger von den vielen angestellten Versuchen ist, welche alle ähnliche Resultate gegeben haben, zeigt mit aller Deutlichkeit die Bedeutung der Immunität. Wenn sich im Experiment eine so auffallende Wirkung wahrnehmen lässt, ist kaum ein Zweifel daran möglich, dass auch die Impfung beim Menschen eine Wirkung haben muss.

Es gilt sicher hier das gleiche wie bei der Anwendung von Diphtherieserum, bei dem ja auch stark bezweifelt wurde, ob es überhaupt wirke. Das rührt davon her, dass die Behandlung mit Diphtherieserum oft zu spät im Verlaufe der Erkrankung vorgenommen worden ist, und nicht etwa davon, dass dieses Serum, welches im Experiment eine so auffallende Wirkung zeigt, bei der menschlichen Diphtherie wirkungslos ist. Die Skepsis, die viele gegenüber der Calmettevakzination hegen, beruht sicherlich auch darauf, dass die Impfung nicht rationell durchgeführt worden ist.

Um erwarten zu können, dass eine Immunität entstanden ist, muss man verlangen, dass alle Geimpften eine positive Tuberkulinreaktion infolge der Vakzination aufweisen. Das ist mit aller Deutlichkeit von Heimbeck<sup>6)</sup> gezeigt worden, welcher 10 Tuberkulin-negative Lehrschwestern erwähnt, die subkutan mit 0,03 mg BCG geimpft wurden. Da die BCG-Kultur langsam gewachsen war, musste man sie 45 Tage im Brutschrank stehen lassen, um eine ausreichende Kultur zur Zubereitung des Impfstoffes zu erhalten. Bei keiner der 10 Lehrschwestern entwickelte sich eine positive Pirquet' Reaktion

infolge der Vakzination, und bei 5 von ihnen entstand später eine Tuberkulose.

Was die Tuberkuloseprophylaxe anbetrifft, so ist kaum ein Zweifel daran möglich, dass eine Vakzination besonders in diesen Zeiten, in denen eine Verminderung der natürlichen Resistenz zu erwarten ist, von grosser Bedeutung werden kann.

Bezüglich der Therapie möchten wir noch einmal erwähnen, dass die Tuberkelbazillen, sobald sie sich ausserhalb des reaktionsfähigen Gewebes des Organismus vorfinden, die Bedingungen haben, um sich vermehren und durch eine endogene Inhalation bei Hustenstössen über ständig grössere und grössere Lungenpartien ausbreiten zu können. Es ist nicht schwer zu verstehen, von welcher Bedeutung Hohlräume, wie z. B. Kavernen, für die Erhaltung und Weiterentwicklung der Lungentuberkulose sein können, und welche günstige Wirkung ein Pneumothorax oder eine Saugdrainage haben kann.

Wenn wir nun zur Besprechung der Chemotherapie übergehen, wird sich wieder ein Beispiel dafür ergeben, wie die Tuberkuloseimmunität das Behandlungsergebnis beeinflusst.

Nach *Ehrlich* versteht man unter Chemotherapie die Behandlung von Infektionskrankheiten mit chemischen Stoffen, welche, ohne dem Makroorganismus einen wesentlichen Schaden zuzufügen, den infizierenden Mikroorganismus entweder zu töten oder dessen Vermehrung zu hemmen vermögen, wodurch die Niederkämpfung der Infektion erreicht wird.

Eine systematische chemotherapeutische Forschung, wie sie *Ehrlich* einführte, konnte erst geschaffen werden, nachdem die spezifische mikrobielle Ursache der Infektionskrankheiten erkannt und Methoden zur Reinzüchtung der verschiedenen Bakterien gefunden waren. Erst als man über Reinkulturen verfügte, vermochte man solche bekannte und graduierte experimentelle Tierinfektionen zu erzeugen, denen gegenüber man die Wirkung der chemotherapeutischen Mittel erproben konnte.

Experimentelle Tierinfektionen lassen sich freilich nicht immer mit den entsprechenden Spontaninfektionen beim Menschen ver-



gleichen; aber es herrscht doch bei vielen Infektionen eine so gute Übereinstimmung, dass wesentliche Schlussfolgerungen berechtigt sind, und auf jeden Fall kann man durch das Experiment in Erfahrung bringen, wie toxisch der Stoff ist, wie er resorbiert und ausgeschieden wird, und ob er überhaupt irgendeine Wirkung auf die Infektion hat, sei es durch eine direkte Hemmung oder Tötung des Mikroorganismus oder durch eine mehr indirekte Wirkung über die eigenen Abwehrveranstaltungen des Makroorganismus. Diese Aufschlüsse sind dann von der allergrössten Bedeutung, wenn das Mittel zum ersten Male bei Menschen angewandt werden soll. Es besteht auch kein Zweifel darüber, dass viele Unglücksfälle hätten vermieden werden können, wenn man sich gute Zeit zu den Tierversuchen genommen hätte.

Die ersten chemotherapeutischen Versuche wurden mit Stoffen wie Sublimat und Karbol ausgeführt, deren grosse bakterientötende Wirkung man von Reagenzglasversuchen her kannte. Diese Stoffe erwiesen sich indessen als gänzlich ungeeignet, da ihre Giftigkeit für das Tier grösser war als für die Bakterien. Als Proteinausfällungsmittel wirkten sie stark gewebsschädigend und wurden durch den Ausfällungsprozess daran gehindert, an den Mikroorganismus heranzukommen. Ihre Organotropie, d. h. ihre Affinität zu den Geweben, war zu gross, — wie *Ehrlich* es ausdrückte.

Von dem Gedanken ausgehend, dass die Organotropie und Parasitotropie der Stoffe nicht parallel zu verlaufen brauchte, richtete *Ehrlich* seine Bestrebungen darauf, Stoffe zu finden, die zugleich mit einer grossen Parasitotropie die geringstmögliche Organotropie aufwiesen, um hierdurch die *„Therapia sterilisans magna“* möglich zu machen.

*Ehrlich ging zuerst darauf aus, einen Stoff mit einer sichtbaren parasitotropen Wirkung zu finden, um dann durch systematische Substituierungen in seinem Molekül die Veränderung desselben in der Richtung einer ständig grösseren Parasitotropie und geringeren Organotropie zu versuchen.*

Während in der ersten Periode der Chemotherapie grosse Ergebnisse gegenüber den Protozoen- und Spirochätenerkrankungen erreicht wurden, fehlten noch ständig Mittel gegen die eigentlichen bakteriellen Infektionen. Viele hielten es sogar für unwahrscheinlich, dass es überhaupt Stoffe gebe, die den Bakterien mehr schaden als dem Wirtsorganismus. Dieser Zweifel wurde jedoch gründlich beseitigt, als *Mietzsch* und *Klarer* 1932 das *Prontosil* hergestellt hatten, welches von *Domagk* bei Streptokokkeninfektionen von Mäusen durchgeprüft wurde. Auf die weitere Entwicklung möchte ich hier nicht eingehen, da dieselbe so gut bekannt ist, dass sie nicht näher besprochen zu werden braucht.

Die Präparate wurden besser, die eine Infektionskrankheit nach der anderen konnte mit fast mirakulösem Heilerfolg behandelt werden. Es war daher auch ganz natürlich, dass man sich experimentell darüber Klarheit zu verschaffen versuchte, wie die Tuberkulose beeinflusst werden könnte. — Es liegen denn auch zahlreiche Mitteilungen über derartige Untersuchungen vor. Wir wollen kurz einige derselben besprechen. Hauptsächlich ist die Wirkung von Sulfanilamid und Sulfapyridin auf experimentelle Meerschweinchentuberkulose untersucht worden.

Besonders eine Arbeit von *Arnold Rich & Follis*<sup>7)</sup> hat auf Grund der guten mit Sulfanilamid erreichten Behandlungsergebnisse Aufsehen erregt.

59 Meerschweinchen von ca. 400 g Gewicht wurden mit einem humanen Tuberkelbazillenstamm infiziert. Die Behandlung wurde 3 Tage vor der Infektion begonnen. Die Versuchstiere wurden in 3 Serien eingeteilt.

*Serie 1* umfasste 7 Kontrolltiere sowie 10 Tiere, die oral 100 mg Sulfanilamid täglich erhielten (ca. 250 mg pr. kg Meerschweinchengewicht täglich).

*Serie 2* umfasste 6 Kontrolltiere sowie 6 Tiere, die oral 100 mg Sulfanilamid 2mal täglich erhielten (500 mg pr. kg Meerschweinchengewicht täglich).

*Serie 3* umfasste 15 Kontrolltiere sowie 15 Tiere, die oral in der folgenden Weise behandelt wurden: Um 9 Uhr, um 14 Uhr und um 18 Uhr 100 mg, sowie um 23 Uhr 200 mg Sulfanilamid (ca. 1250 mg pr. kg Meerschweinchengewicht täglich). Alle Tiere, die nicht in der Zwischenzeit gestorben waren, wurden nach 5 und 6 Wochen getötet.

*Serie 1* zeigte keine Wirkung.

In *Serie 2* hatten die behandelten Tiere erheblich geringere Prozesse. Alle Kontrolltiere hatten Knötchen in der Milz, während nur eins von den behandelten Tieren solche aufwies. Ebenso waren die lokalen Prozesse und regionären Drüsen beträchtlich kleiner bei den behandelten Tieren. Bei der histologischen Untersuchung wurden Tuberkelbazillen bei allen Tieren gefunden, aber es waren erheblich mehr bei den Kontrollen. Ausserdem ergab die histologische Untersuchung, dass bei den behandelten Meerschweinchen kein käsiger Zerfall vorkam, wie man ihn bei den Kontrolltieren sah.

In der Serie 3 war der Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren noch ausgeprägter zugunsten der ersten; aber es muss doch hinzugefügt werden, dass 9 von den 15 behandelten Meerschweinchen an Intoxikation eingingen, ehe die Versuchsperiode abgelaufen war, wodurch eine Auswahl der am meisten resistenten Tiere bewirkt wurde.

In einer anderen Arbeit untersuchte *Follis*<sup>8)</sup> die Wirkung, die Sulfanilamid, Acetylsulfanilamid und Sulfapyridin in vitro in Proskauer Beck's synthetischem Nährboden hatte. Die beiden erstgenannten Stoffe übten, selbst in einer Konzentration von 100 mg %, keine Wirkung auf das Wachstum des Tuberkelbazillus aus, während das Sulfapyridin etwas hemmend bei einer Konzentration von 50 mg % und völlig hemmend auf das Wachstum bei 75 mg % wirkte.

*Birkhaug*<sup>9)</sup> hat in umfassenden Untersuchungen die Wirkung von Prontosil soluble und Sulfapyridin studiert. In seiner ersten Arbeit infizierte er 48 Meerschweinchen mit  $10^{-5}$  mg einer bovinen Kultur. 24 von den Meerschweinchen wurden mit intramuskulärer Injektion von Prontosil soluble behandelt, und zwar erhielten sie 5 mg täglich durch 4 Wochen hindurch, 12,5 mg täglich durch 8 Wochen hindurch und 25 mg täglich durch 9 Wochen hindurch, insgesamt also 2,50 Gram. 3 der behandelten Tiere verendeten vor dem 159. Tage. Der Rest wurde vom 159. bis 162. Tage nach der Infektion getötet, — von den Kontrolltieren gingen 9 am 75.—142. Tage nach der Infektion an generalisierter Tuberkulose ein. Der Rest wurde am 153.—157. Tage nach der Infektion getötet.

Alle behandelte Tiere hatten tuberkulöse Prozesse, welche jedoch beträchtlich weniger entwickelt waren als bei den Kontrolltieren. Die histologische Untersuchung zeigte Prozesse sowohl bei behandelten als auch bei unbehandelten Tieren; aber dieselben waren mehr unscheinbar und von geringerer Ausdehnung bei den behandelten, und zugleich gab es hier weniger Tuberkelbazillen. Bei quantitativer Aussaat von 6 behandelten Tieren und 6 Kontrollen wurde gefunden, dass die Milz ca. 5mal, die Leber ca. 30mal und die Lunge ca. 15mal so viele T. B. bei den Kontrollen enthielt als bei den behandelten Tieren.

In einer anderen Arbeit<sup>10)</sup> untersuchte derselbe Autor in gleicher Weise die Wirkung des Sulfapyridins. Er prüfte zuerst die Wirkung von Sulfapyridin und Prontosil rubrum und Sulfanilamid in vitro, wozu er Sautons Nährboden (synthetisch ohne Proteinstoff) verwandte. Derselbe wurde sowohl mit humanen als auch mit bovinen T. B. beimpft. Es gab einen gewissen Grad von Wachstumshemmung bei 10 mg % Sulfapyridin und Prontosil rubrum, aber nicht bei Sulfanilamid, bei dem man bis auf 50 mg % heraufgehen

musste, um irgendeine Wirkung erzielen zu können. — Selbst 90 mg % dieser 3 Stoffe verursachten nur Wachstumshemmung, aber keine Tötung.

Versuche in vivo mit Sulfapyridin: Die Tiere wurden mit 0,1 mg eines bovinen Stammes infiziert und dann auf folgende Weise behandelt:

Gruppe II ca. 600 mg pr. kg Meerschweinchen täglich.

Gruppe I ca. 300 mg pr. kg Meerschweinchen täglich.

Die Sektion wurde 15 Wochen nach der Infektion vorgenommen. Als Resultat ergab sich, dass die grösste Dosis Sulfapyridin sowohl die makroskopisch als auch die mikroskopisch sichtbare Entwicklung von tuberkulösem Gewebe, ebenso wie in den vorhergehenden Versuchen, hemmte.

*Aussaat:* Milz ca. 100mal mehr T.B. (bei den Kontrolltieren). Leber ca. 30mal mehr T.B. und Lunge ca. 14mal mehr T.B.

Blutkonzentration 600 mg pr. kg in 3 Dosen, 8,6—22,8 mg %; der Zeitpunkt der Blutprobe ist nicht angegeben.

Einige Forscher haben ähnliche Resultate, doch keine so durchschlagende Wirkung erzielt. *Buttle & Parish*<sup>11)</sup> wandten Sulfanilamid an. Meerschweinchen wurden mit humanen und bovinen T.B. infiziert. — Behandlung 500 mg täglich verteilt auf 4 Dosen (ca. 1000 mg pr. kg) 5 Tage lang, dann  $\frac{1}{2}$  Dosis vom 6.—42. Tage.

*Humane T. B.* Alle Tiere hatten Knötchen in der Milz, die bei den Behandelten am geringsten entwickelt waren.

*Bovine T. B.* Keine Wirkung. Versuch mit Kaninchen resultatlos.

*Grey, Cambel & Cully*<sup>12)</sup>. Die Meerschweinchen wurden mit einem humanen Stamme infiziert. Die Behandlung (100 mg 3mal täglich) wurde 3 Tage vor der Infektion begonnen; bei 2 anderen Gruppen begann die Behandlung 17 bzw. 24 Tage nach der Infektion. Von den Tieren, bei denen die Behandlung 3 Tage vor der Infektion begonnen wurde, waren die tuberkulösen Prozesse von grösserer Ausdehnung (sowohl makro- als auch mikroskopisch gesehen) bei den Kontrollen und es gab hier auch mehr T.B. Die beiden anderen Gruppen zeigten keinen Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren.

Eine Reihe Autoren haben keine Wirkung der Sulfanilamidbehandlung wahrgenommen. *Kolmer, Raiziss & Rule*<sup>13)</sup> behandelten auf verschiedene Weise. Eine Gruppe bekam 100 mg, eine Gruppe 150 mg und eine Gruppe 200 mg zweimal täglich intramuskulär. Die Behandlung war erfolglos, sogar in einem Versuche, in welchem sie ca. 2000 mg pr. kg Meerschweinchengewicht gaben. Ausserdem untersuchten sie 5 andere vom Sulfanilamid ausgehende Derivate, die auch alle wirkungslos waren.

*Smithburn*<sup>14)</sup> infizierte die Tiere intrazerebral mit humanen Tu-

berkelbazillen und behandelte mit 600 mg Sulfanilamid pr. kg Meerschweinchengewicht täglich, ohne irgendeine Wirkung der Behandlung feststellen zu können.

Andere Autoren ausser dem schon erwähnten *Birkhaug* haben auch die Wirkung von Sulfapyridin untersucht. *Flippin*<sup>15)</sup> — Infektion mit humanen T. B. Behandlung 100 mg 2mal täglich oral. Die Behandlung wurde sofort oder nach 2 Wochen begonnen. Die Tiere wurden nach 4 Wochen getötet. Aussaat aus der Milz: Kein Unterschied der Kolonienzahl bei den behandelten Tieren und den Kontrollen.

*Heise & Steenken*<sup>16)</sup> untersuchten die Wirkung von Sulfapyridin *in vitro*. Keine Totalhemmung, nicht einmal bei 80 mg % (Proskauer Beck's Nährboden), schwache Hemmung bei 5 mg %, stärkere bei 10 mg %. *In vivo* Infektion: Inhalation humaner T. B. Behandlung oral. Blutkonzentration: Freier Stoff 6,5—10 mg % 4 Stunden nach der oralen Eingabe. Die Behandlung wurde 1 Monat nach der Infektion begonnen. Keine nennenswerte Wirkung.

Schliesslich sei erwähnt, dass *Climenko*<sup>17)</sup> fand, dass ein fettlösliches Sulfanilamidpräparat, N-Dodecanoylsulfanilamid, in einer Dosis von 100 mg täglich oral die Entwicklung der tuberkulösen Prozesse bei Meerschweinchen hemmte.

*Steinbach*<sup>18)</sup>, der diese Versuche ganz genau nachprüfte, erzielte keine Wirkung mit diesem Stoffe.

Wie man aus diesem Literatúrauszug über die Wirkung der Sulfonamide (insbesondere Sulfanilamid und Sulfapyridin) auf experimentelle Meerschweinchentuberkulose erschen kann, scheint dieselbe recht problematisch zu sein; es liegt auf jeden Fall kein Bericht über eine vollkommene Heilwirkung vor. Keiner der Autoren hat einen rationellen Versuch zur Messung der Konzentration der angewandten Stoffe im Blute gemacht. Im ganzen genommen ist zu sagen, dass wir diese Untersuchungen mit einer gewissen Skepsis betrachteten.

Wir haben im Verlauf der Jahre die Wirkung vieler verschiedener Stoffe auf die experimentelle Meerschweincentuberkulose geprüft (chemische Mittel, Antigene verschiedener Art von lebenden B. C. G. bis zu verschiedenen Fraktionen der T. B.), ohne dass wir jemals das geringste günstige Resultat erzielt hätten, eher das Gegenteil.

Der Weg also, den *Ehrlich* gegangen war, nämlich zuallererst einen Stoff mit einer sichtbaren parasitotropen Wir-

kung ausfindig zu machen, erscheint uns gesperrt zu sein, und wir müssen zugeben, dass wir von der von angesehenen Tuberkuloseforschern aufgestellten Behauptung beeindruckt waren, eine Chemotherapie der Tuberkulose sei unerreichbar. Erstens, weil Tuberkelbazillen so resistent gegenüber schädlicher Einwirkung sind, und zweitens, weil die Tuberkelbazillen in Hohlräumen in verkästen Massen liegen, wo es keine Gefäßversorgung gibt und infolgedessen der Stoff nur schlechte Möglichkeiten hat, an sie heranzukommen.

Als wir indessen von Løvens Chemischer Fabrik gebeten wurden, die Wirkung des N-dodecanoylsulfanilamids auf experimentelle Tuberkulose zu untersuchen, willigten wir ein, noch einen Versuch zu machen.

Der nun zu besprechende Teil der Arbeit kam durch ein Zusammenwirken zwischen der biologischen Abteilung von Løvens Chemischer Fabrik und dem Institut für allgemeine Pathologie zustande.

Der erste Schritt, einen Stoff mit einer gewissen Wirkung zu finden, ist besonders schwierig, wenn es sich um ein Leiden wie Tuberkulose handelt. Die Versuche brauchen lange Zeit. Was man mit anderen Bakterien in einem oder wenigen Tagen ausführen kann, dauert bei dem Tuberkelbazillus Monate. Die Tierversuche sind langwierig und teuer. Wir begannen deshalb auch mit der Untersuchung *in vitro*. Zu diesem Zwecke nahmen wir eine Reihe der bekanntesten Präparate und setzten sie in fallenden Dosen zu Nährböden, die sich zur Züchtung von Tuberkelbazillen eigneten. Zuerst wandten wir Sautons synthetischen Nährboden an; der Versuch ergab, dass einige der benutzten Stoffe völlig das Wachstum der ausgesäten Tuberkelbazillen hemmten, und zwar ganz herunter bis zu einer Konzentration von 5 mg %. Es war jedoch ein Nachteil dieses Nährbodens, dass er keinen Proteinstoff enthielt, weswegen wir das Resultat nicht direkt auf die Verhältnisse *in vivo* übertragen konnten. Wir wandten daher in den folgenden Versuchen einen modifizierten Löwensteins Nährboden an, dessen Eigenschaften und Zusammensetzung in früheren Arbeiten<sup>5)</sup> beschrieben worden sind. Dieses Substrat, das aus ganzen Eiern besteht, ist so reich an Proteinstoffen, dass ein direkter Vergleich mit den Verhältnissen *in vivo* mehr berechtigt ist. Es wurden zu diesem Nährboden die verschiedenen Präparate in fallender Konzentration (10—5—2<sup>1</sup>/<sub>2</sub>—1<sup>1</sup>/<sub>4</sub>—5/8 mg %) hinzugesetzt.

Tabelle 2.

Stoff.	10 <sup>-5</sup>							10 <sup>-6</sup>						
	mg <sup>0</sup> / <sub>0</sub>							mg <sup>0</sup> / <sub>0</sub>						
	Tg.	10	5	2,5	1,25	0,62	0	10	5	2,5	1,25	0,62	0	
Sulfathiazol	22		0	0	0	27	29		0	0	0	0	2	
	30		0	0	1	57	33		0	0	0	0,3	4	
	37		0	0	8,2	63			0	0	0,4	1,5		
	50		0	2,4	33				0	0	1,6	2,1		
	90		0	19					0	1,7	1,6			
Sulfaäthylthio- diazol.	22	0	0	0	0,6		29	0	0	0	0		2	
	30	0	0	0	14		33	0	0	0	2,6		4	
	37	0	0	3,2	28			0	0	0	3,6			
	50	0	0	11	32			0	0	0	4,8			
	90	0	0	18				0	0	1				
Sulfaisobutyl- thiodiazol.	22	0	0	11	12		29	0	0	0,5	0,2		2	
	30	0	1	20	21		33	0	0,8	1,5	1,7		4	
	37	0	7	21	26			0	1,8	1,5	2			
	50	0	19	21				0	3	2				
	90	0,2	19	21				0						
Sulfamethyl- thiodiazol.	22	0	0	0	0		29	0	0	0	0		2	
	30	0	0	0	0		33	0	0	0	0		4	
	37	0	0	0	6			0	0	0	0,3			
	50	0	0	0	21			0	0	0	1,3			
	90	0	0	0				0	0	1	2			

## Erklärung zu Tabelle 2.

In den Tabellen sind nur die Stoffe aufgeführt, die eine gewisse Wirkung mit der höchsten angewandten Konzentration zeigten.

In den Versuchen sind, ausser den in der Tabelle angeführten, folgende Stoffe untersucht worden: *Prontosil rubrum*, *Neo-Uliron*, *Prontosil sol*, *Pyramid*, *Acetylpyramid*, *Sulfaphenylthiazol*, *Sulfaoxyphenylthiazol*.

Die Zahlen in der obersten Kolonne geben das mg % des Stoffes an. — Die Zahlen in der ersten senkrechten Kolonne geben den Zeitpunkt für die Zählung der Kolonien an, während die Zahlen in der Tabelle die durchschnittliche Kolonienzahl bezeichnen.

Alle diese Gläser + Kontrollgläser wurden mit  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  mg einer humanen bzw. bovinen Kultur beimpft. Es wurden 5–10 Gläser mit jeder Konzentration beimpft, die Anzahl der Kolonien wurde gezählt und die Mittelzahl in der Weise ausgerechnet, dass man ausser den absoluten Tötungszahlen auch einen Massstab für die Wachstumshemmung erhielt.

Tabelle 3.

	1. Monat		2. Monat		Endergebnis	
	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
1) Präparat Chemosept .....	1,25	1,25	5	5	5–10	5–10
2) „ Sulfapyridin .....	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
3) „ Prontosil rubrum.....	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
4) „ Uliron 337 .....	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
5) „ Uliron C 11 a. ....	10	5–10	> 10	> 10	> 10	> 10
6) „ Neo Uliron 537 .....	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
7) „ Prontalbin 739 .....	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
8) „ Prontosil sol. ....	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
10) „ {Staphylamid. ....}	2,5	2,5	5–10	5–10	> 10	10
„ {Sulfamethylthiazol....}						
11) „ Sulfathiazol.....	1,25	1,25	2,5–5	2,5	5–10	5–10
12) „ Pyriamid .....	10	5	> 10	> 10	> 10	> 10
13) „ Acetyl Pyriamid .....	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
14) Präparat Sulfaphenylthiazol....	10	10	> 10	> 10	> 10	> 10
15) „ Sulfaoxyphenylthiazol.	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
16) „ Sulfaäthylthiodiazol...	2,5	1,25–2,5	5	2,5	5	2,5–5
17) „ Sulfaisobutylthiodiazol	5–10	5–10	10	10	> 10	> 10
18) „ Sulfamethylthiodiazol.	1,25	1,25	2,5	2,5	2,5	2,5
22) „ Sulfathiodiazol.....	2,5	2,5	5	2,5–5	5	5

Tabelle 2 gibt einen der ausgeführten 10 Versuche wieder. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse sämtlicher Versuche zusammengefasst; es ist hier nur die kleinste Dosis angeführt, die zu dem angegebenen Zeitpunkte die Entstehung von makroskopisch (mit Lupe) sichtbaren Kolonien noch verhindert hat. Bei den Stoffen, bei denen eine Wirkung festgestellt wurde, ist der Versuch mindestens 3mal wiederholt worden,



ohne dass sich nennenswerte Abweichungen zeigten. Die Stoffe über dem Strich in der Tabelle wurden im Rahmen der ersten orientierenden Untersuchung geprüft.

Da es sich, wie aus der Tabelle hervorgeht, gezeigt hatte, dass die einzigen Stoffe mit einer gewissen Wirkung das Sulfamethylthiazol und das Sulfathiazol waren, wurden eine Reihe von verschiedenen Präparaten, insbesondere Sulfathiazolen und Sulfathiodiazolen, zubereitet, um wenn möglich einen Stoff mit noch grösserer Wirkungsfähigkeit ausfindig zu machen. Diese Stoffe sind unterhalb des Striches in Tabelle 3 angeführt.

Das Resultat ergibt sich deutlich aus den Tabellen; wir möchten nur davon hervorheben, dass die bovinen Stämme durchgängig zweimal so resistent als die humanen sind.

K. Schmith & F. Reymann<sup>18a</sup>) haben in einer Untersuchung über die Resistenz der Gonokokken gegenüber Sulfonamiden herausgefunden, dass die verschiedenen Stämme einen grossen Resistenzunterschied aufwiesen. Um zu untersuchen, ob sich etwas Ähnliches bei den verschiedenen Tuberkelbazillensstämmen geltend machte, wurden Versuche mit insgesamt 8 verschiedenen humanen Tuberkelbazillensstämmen ausgeführt. Alle 8 zeigten dieselbe Resistenz.

#### *Versuche in vivo.*

Nachdem wir so in Erfahrung gebracht hatten, dass einige dieser Stoffe eine wachstumshemmende oder tötende Wirkung auf T. B. ausübten, und zwar in Dosen bis herunter zu 2,5 mg %, welche Konzentration sich mit Leichtigkeit in Blut und Gewebe bei Verabreichung dieser Stoffe an den Menschen erzielen lässt, und da es sich sogar in diesem Falle um einen Nährboden handelte, der an Proteingehalt nicht hinter dem menschlichen Körper zurückstand, war allerhöchster Grund vorhanden, auch die Wirkung dieser Präparate in vivo zu prüfen.

Die zuerst untersuchten Stoffe waren das Sulfathiazol und das Sulfamethylthiazol, sowie, obgleich es keine besondere Wirkung in vitro aufgewiesen hatte, auch das Sulfapyridin; teils, weil andere damit Erfolge bei Versuchen in vivo erzielt hatten, und teils auch um zu kontrollieren, ob man durch

Untersuchung der in vitro eintretenden Wirkung irgendeinen Anhaltspunkt dafür bekam, ob der Stoff auch eine Wirkung in vivo hatte.

### *Versuche in vivo — orale Eingabe.*

Überall in dieser Arbeit, wo die Rede von oraler Eingabe ist, ist der Stoffe mit Sonde gegeben worden.

47 Meerschweinchen von ca. 300 g wurden subkutan mit 10—3 eines humanen Stammes infiziert, 9 dienten als Kontrollen.

9 wurden mit 100 mg Sulfathiazol 2mal täglich behandelt = 600—700 mg pr. kg Meerschweinchengewicht täglich. Die Behandlung begann 2 Tage vor der Infektion.

7 wurden mit der gleichen Dosis 5 Tage nach der Infektion behandelt.

8 wurden mit 50 mg Sulfathiazol 2mal täglich 2 Tage vor der Infektion behandelt.

7 wurden mit 100 mg Sulfamethylthiazol 2mal täglich 2 Tage vor der Infektion behandelt.

7 wurden mit 100 mg Sulfapyridin 2mal täglich 2 Tage vor der Infektion behandelt.

Die behandelten Tiere ertrugen die Verabreichung nur 6 Tage lang. Nach einer Pause von  $2\frac{1}{2}$  Tagen wurde mit der Behandlung fortgesetzt. Mit regelmässigen Zeitabständen wurden Tiere von jeder Gruppe getötet und Aussaat aus Drüsen und Milz vorgenommen. Ausserdem wurde der Zeitpunkt des Erscheinens des lokalen Prozesses aufnotiert.

Im ganzen kann man von der Versuchsserie sagen, dass es keine Wirkung dieser Stoffe gab. Der Lokalprozess trat zu ungefähr dem gleichen Zeitpunkte auf, das Wachstum aus Drüsen und Milz gab ungefähr dasselbe Resultat bei allen Gruppen, und die Tiere, welche so spät getötet wurden, dass makroskopisch sichtbare Prozesse entstanden waren, zeigten eine ganz gleichartige Ausbreitung derselben. — Doch schienen die mit Sulfamethylthiazol behandelten Tiere etwas, wenn auch nicht viel, günstiger gestellt zu sein als die übrigen.

Dieses Resultat war nicht besonders ermutigend, und hätten wir uns nicht darauf stützen können, dass diese Stoffe eine so gute Wirkung in vitro ausübten, wäre wohl kaum Grund gewesen, mit den Versuchen weiter fortzufahren.

Unser erster Gedanke war, dass die Konzentration dieser Stoffe im Gewebe und Blut der Versuchstiere nach oraler

Verabreichung nicht einen konstanten Wert von 5 mg % und mehr erreichte. Wir gingen deshalb dazu über, die Blutkonzentration dieser Stoffe nach oraler Eingabe zu messen. \*) In diesen Versuchen haben wir Präparat Nr. 18 mitgenommen, da es die kräftigste Wirkung in vitro zeigte, die überhaupt von uns erzielt worden war.

In dem ersten Versuch wurde eine einzige Dosis von 100 mg oral gegeben, und die Blutkonzentration wurde 2, 4, 8 und 12 Stunden nach der Verabreichung gemessen. Das Ergebnis geht aus Fig. 3 hervor.

Jeder Stoff ist an 2 Meerschweinchen untersucht worden; die Kurve gibt den Durchschnitt an.

In dem zweiten Versuch wurden insgesamt 7 Portionen mit 12stündigem Intervall gegeben, und die Blutkonzentration wurde nach der letzten Verabreichung bestimmt (s. Fig. 4). Wie man aus den Kurven ersieht, lässt sich keine konstante Blutkonzentration erzielen, die über 5 mg % liegt, wenn die Stoffe 2mal täglich oral gegeben werden. Da es aus technischen Gründen unmöglich war, die Tiere Tag und Nacht hindurch mit den erforderlichen kleinen Zeitabständen (jede 4. bis 6. Stunde) mit den Stoffen zu füttern, und da auch die Meerschweinchen die orale Eingabe nur eine recht kurze Zeit hindurch ertrugen, führten wir einige Versuche aus, um eine Methode ausfindig zu machen, bei der die Blutkonzentration den ganzen Tag lang konstant und am liebsten höher als 5 mg % bei zweimaliger Verabreichung täglich war.

Wir versuchten zuerst eine Aufschwemmung des Stoffes in Oel 2mal täglich subkutan einzuspritzen. Hierbei gelang es eine recht hohe konstante Blutkonzentration (ca. 5 mg %) zu erzielen; doch entstanden nach recht wenigen Injektionen grosse und speckige Infiltrate, und der Allgemeinzustand der Tiere wurde so schlecht, dass diese Methode verlassen werden musste. Wir gingen daher dazu über, den Stoff in feiner Emulsion in Salzlösung oder Gummisalzlösung subkutan einzuspritzen. Die Versuche wurden in gleicher Weise wie bei

---

\*) Alle Messungen der Blutkonzentration der verschiedenen Stoffe werden von C. Jensen, Biologische Abteilung von *Lovens chemiske Fabrik*, ausgeführt. Die Methode wird später veröffentlicht werden.

## Orale Aufnahme bei Ratte

Fig. 3.

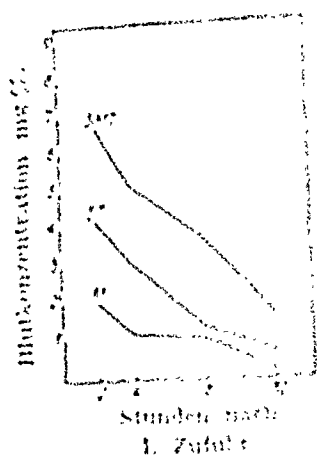
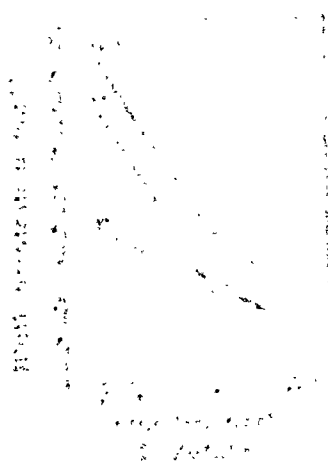
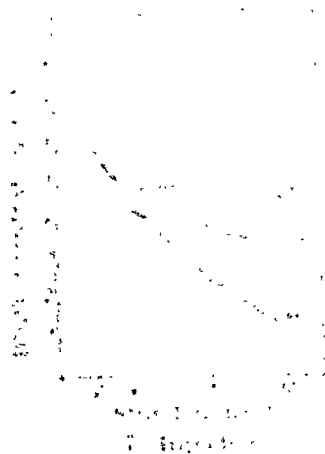
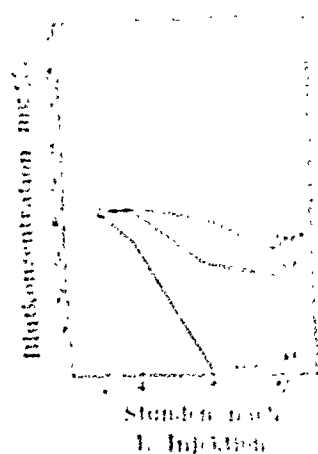


Fig. 4.



## Injektionsaufnahme bei Ratte

Fig. 5.



oralen Eingabe ausgeführt und sind in Figur 3 und 4 wieder gegeben.

Wie man daraus ersieht, gelang es mit dem Sulfamethylthiazol nach recht wenigen zweimal täglich vorgenommenen Injektionen eine den ganzen Tag hindurch konstante Blut

konzentration von ca. 5 mg % zu erreichen. Die Konzentration war bei dem Sulfathiazol etwas niedriger und bei dem Präparat 18 noch niedriger; da aber diese beiden Stoffe in vitro noch eine Wirkung bis ganz herunter zu 2,5 mg % gezeigt hatten, nahmen wir sie auch in den Versuchen in vivo mit. Ausserdem prüften wir noch einmal Sulfapyridin bei oraler Eingabe.

Überall in den Tabellen, wo die Blutkonzentration angegeben ist, ist die Bestimmung auf jeden Fall 12 Stunden nach der letzten Verabreichung vorgenommen worden, sodass die angeführten Zahlen den Minimumgehalt im Laufe eines Tages darstellen.

### *Versuche mit subkutaner Einspritzung der Stoffe und subkutaner Infektion.*

3 Versuche dieser Art sind ausgeführt worden.

#### Versuch 1.

Die Tiere wurden subkutan am Bauch mit 10—4 mg eines humanen Stammes infiziert. Sie wurden in mehrere Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe diente als unbehandelte Kontrolltiere, die zweite wurde mit 500 mg Präp. 11 pr. kg Meerschweinchengewicht 2mal täglich subkutan behandelt. Diese Behandlung hielten die Tiere 8—10 Tage aus; danach kam es zu einer Periode, in welcher am Bauch, besonders auf der Seite, wo die Infektion vor sich gegangen war, ein kräftiges Oedem und Hyperämie auftrat, ja sogar Hämorrhagien. In dieser Periode war der Allgemeinzustand der Tiere ebenfalls schlecht, weswegen die Dosis reduziert werden musste. Bei einigen von ihnen musste eine Behandlungspause von 2—7 Tagen eingefügt werden, wonach mit 260 mg pr. kg Meerschweinchengewicht zweimal täglich fortgesetzt wurde. Diese Behandlung wurde mehrere Monate hindurch fortgeführt, ohne dass die Tiere einen nennenswerten Schaden davon zu haben schienen.

Die 3. Gruppe wurde mit Präp. 10 in der gleichen Weise und mit denselben Folgen behandelt.

Die 4. Gruppe wurde mit Präp. 11 in derselben Weise wie Gruppe 2 behandelt; aber die Behandlung wurde erst 7 Tage nach der Infektion begonnen.

Die 5. Gruppe wurde oral mit 100 mg Sulfapyridin 2mal täglich behandelt. Schliesslich wurden einige wenige Tiere mit Präp. 18 in der gleichen Weise wie Gruppe 2 behandelt — Gruppe 6.

Nach der Infektion wurde die Inokulationsstelle sorgfältig beobachtet und der Zeitpunkt der Entstehung des lokalen Prozesses notiert, sowie dessen Grösse ständig während des ganzen Versuches gemessen. Das gleiche galt für die regionären Drüsen.

Infolge unserer Unkenntnis der erwähnten Periode, in welcher die Tiere den eingegebenen Stoff nur schlecht ertrugen, kam es zu einer Anzahl von Todesfällen an medikamentöser Intoxikation. So starben 8 von 12 mit Sulfamethylthiazol behandelten Tieren vom 7. bis zum 12. Tage, 8 von 24 mit Sulfathiazol behandelten Tieren vom 4. bis zum 14. Tage und 1 am 39. Tage, 3 von 5 mit Präp. 18 behandelten Tieren vom 13. bis zum 18. Tage sowie 1 von 4 mit Sulfapyridin behandelten Tieren am 39. Tage. Diese Tiere sind in der Tabelle nicht mitaufgeführt. Keines der Kontrolltiere ging ein.

Am 43., 60., 84. und 128. Tage wurden einige Tiere von jeder Gruppe getötet. Die makroskopisch sichtbaren Prozesse wurden aufgenommen und quantitative Aussaat aus der regionären Drüse, der Leberpfortendrüse und der Milz, wie oben beschrieben, vorgenommen.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Tabelle 4 und 5 angeführt. Tabelle 4 zeigt das Ergebnis der Aussaat aus der regionären Drüse, der Leberpfortendrüse und der Milz sowie den Zeitpunkt der Entstehung des lokalen Prozesses und dessen Grösse. Ausserdem ist die Grösse der regionären Drüse angeführt. Es ist hieraus zu erschen, dass bei allen behandelten Tieren der lokale Prozess beträchtlich später als bei den Kontrolltieren auftritt. Am spätesten erscheint er bei den mit Präp. 10 behandelten Tieren, dann folgen die mit Präp. 11, Sulfapyridin oral und Präp. 18 behandelten Tiere. Ebenso kann man sehen, dass der lokale Prozess langsamer wächst, insbesondere bei den mit Präp. 10 behandelten Tieren. Dass der Unterschied zum Schluss nicht grösser wird, ist darauf zurückzuführen, dass der lokale Prozess sich bei den Kontrollen in einem recht frühen Zeitpunkte entleert, während die Perforation bei den behandelten Tieren erst spät oder gar nicht eintrat. Was deshalb die regionäre Drüse anbetrifft, so ist bei ihr der Unterschied in der Grösse noch mehr ausgesprochen, da die Drüse nur selten perforiert. Auch hier zeigen Präp. 10 und 11 die grösste Wirkung.

Tabelle 4.  
Subkutaner Versuch 1.

Getötet Tag	Behandlung	Aussaat								
		Reg. Drüse			Leberpfortendrüse			Milz		
		1/10	1/100	1/1000	unv.	1/10	1/100	unv.	1/10	1/100
43.	Gruppe 1	∞	∞	52	∞	65	9	39	12	2,3
	Gruppe 1	∞	77	10	ca. 200	28	4,6	∞	48	8,6
	Gruppe 2	ca. 100	7,3	1	∞	69	10,3	ca. 100	14	1
	Gruppe 2	11	0	0	127	10	1	28	4,2	1,3
	Gruppe 3	79	11,6	3	82	18	2,6	7	0,2	0
	Gruppe 4	113	31	1,7	∞	76	14	59	9	1,3
	Gruppe 4	ca. 150	33	4,5	∞	114	13	130	25	2,6
	Gruppe 5	53	7	0,5	∞	77	9,7	ca. 200	19	2,6
60.	Gruppe 5	∞	100	23	71	12	1,6	17	0,7	0
	Gruppe 1	ca. 200	27	3	ca. 200	21	2	38	2,5	0,5
	Gruppe 1	∞	45	8	100	8,2	1	43	7,2	2,3
	Gruppe 2	ca. 200	19	3,2	∞	39	5	57	6	0,3
	Gruppe 3	32	5,2	0,6	94	9,7	1,3	2	0	0
	Gruppe 4	31	3,3	0,6	∞	48	5,6	75	7,2	0,6
	Gruppe 4		inf.		∞	49	6,2	19	1,2	0,3
	Gruppe 5	70	7,6	2,3	71	9,2	1,3	8	0,5	0
84.	Gruppe 5	ca. 150	16	2,6	∞	46	5,6	ca. 100	14	2,3
	Gruppe 6	53	8	1,6	∞	57	5,2	6,3	0,2	0
	Gruppe 1	∞	23	2,3	65	7,3	1,3	17	1,6	0
	Gruppe 1	107	19	2,3	112	11	1,2	79	19	2
	Gruppe 2	23	1,6	0	46	4,5	0	6	1	0,3
	Gruppe 2	3,6	0,2	0	5	2	0	0,5	0	0
	Gruppe 3	61	6,3	0,6	106	11	1,2	32	2,3	0,3
	Gruppe 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128.	Gruppe 4	9,6	1,3	0	∞	39	3,7	22	1,5	0
	Gruppe 4	8	0,3	0	29	4	0,5	0	0	0
	Gruppe 4	0	0	0	0,3	0	0	0,6	0	0
	Gruppe 6	0	0	0	1,3	0	0	1,6	0,2	0
	Gruppe 1	13	1	0	28	3,5	0,3	ca. 200	23	3,7
	Gruppe 4	13	2,3	0,5	26	2,7	1	29	2	0,7
	Gruppe 4	150	14	2	ca. 200	23	1,6	ca. 300	33	2,7

Zeitpunkt der Entstehung des lokalen Pro- zesses	Grösse des lokalen Prozesses					Zeitpunkt der Vergrößerung der regionären Drüse	Grösse der regionären Drüse				
	12	22	32	42	52		12	22	32	42	52 Tage
12	2	7p	3p	5p		12	4	10	13	18	
16	0	6	6p	8p		16	4	10	12	12	
26	0	0	8	8		26	0	0	5	8	
26	0	0	10	10		21	0	3	4	7	
28	0	0	4	4		14	0	4	4	4	
25	0	0	3	5		12	3	4	4	6	
32	0	0	3	4		12	3	4	6	8	
19	0	4	6	6		12	3	7	8	9	
19	0	5	4p	4p		12	3	7	10	12	
12	2	5p	5p	5p	5p	12	3	8	16	20	20
14	0	2	5p	5p	5p	12	4	9	12	20	20
21	0	2	7	12	7p	21	0	3	6	10	15
32	0	0	1	2	2	21	0	3	4	6	9
21	0	3	10	10	10	14	0	3	3	3	6
27	0	0	5	5	5	12	3	3	4	4	4
19	0	7	4p	4p	4p	16	0	7	10	14	17
19	0	2	5	7p	7p	21	0	3	5	8	11
18	0	9	7p	7p	7p	18	0	5	7	12	12
14	0	5	8	9p	9p	14	0	7	10	14	14
16	0	2	4	5p	5p	16	0	3	8	12	12
26	0	0	3	5	6	21	0	4	5	6	10
21	0	4	7p	7p	7p	21	0	3	6	6	6
32	0	0	3	8	8	21	0	4	5	10	12
25	0	0	5	6	9	16	0	3	4	4	4
23	0	0	2	3	3	21	0	5	6	6	8
25	0	0	3	5	6	12	4	4	5	5	10
25	0	0	9	9	9	11	2	4	4	4	4
21	0	3	7	10	10	14	0	4	6	6	6
16	0	3	5p	5p	5p	7	10	10	20	20	20
21	0	2	5	7	7p	12	3	7	7	12	10
21	0	3	9	4	4	12	3	5	7	10	12



Tabelle 5.  
Subkutaner Versuch 1. 17-7-1941.

Getötet Tag	Meer- schwein- chen Nr.	Be- hand- lung	Sektion			
			mg %	Reg. Drüse	Leberpf. P.H.	Milz
43.	149	Gruppe 1		18	7	2 hanfsamengrosse Knötchen
	150	» »		12	15	Zahlr. submiliare Knötchen
	105	» 2		8	5	Eine Anzahl bis zu miliumgrosse Knötchen
	107	» »		7	3	2 submiliare Knötchen
	133	» 3		4	5	0 Knötchen
	119	» 4		6	4	0 Knötchen
	120	» »		8	4	0 Knötchen
	141	» 5		9	9	Zahlr. submiliare Knötchen
	142	» »		12	4	0 Knötchen
60.	152	Gruppe 1		20	12	16 bis zu hanfsamengrosse Knötchen
	153	» »		20	10	5 submiliare Knötchen
	114	» 2	3,50	15	10	12 bis zu miliumgrosse Knötchen
	137	» 3	7,50	9	9	0 Knötchen
	123	» 4	3,40	11	12	10 submiliare Knötchen
	124	» »	4,90	7	9	5 gerade noch sichtbare Knötchen
	140	» 5	3,10	17	8	3 submiliare Knötchen
	144	» »	1,75	11	11	16 bis zu miliumgrosse Knötchen
	99	» 6	3,20	12	7	0 Knötchen
84.	154	Gruppe 1		18	9	7 submiliare Knötchen
	155	» »		20	12	Eine Anzahl bis zu miliumgrosse Knötchen
	110	» 2		10	10	10 submiliare Knötchen
	111	» »	3,50	8	5	0 Knötchen
	128	» 3		15	11	Eine Anzahl submiliare Knötchen
	129	» »	6,65	4	2	0 Knötchen
	116	» 4	4,30	12	12	3 submiliare Knötchen
	118	» »	4,05	8	8	0 Knötchen
	127	» »	4,05	5	4	0 Knötchen
	101	» 6		5	8	Vereinzelte submiliare Knötchen
128.	151	Gruppe 1		12	12	Eine Anzahl submiliare Knötchen
	122	» 4		8	8	Angedeutete Knötchenbildung
	126	» »		18	12	Eine Anzahl submiliare Knötchen

Betrachtet man das Ergebnis der Aussaat, so weist ebenfalls Präp. 10 das beste Resultat auf; doch liegen die Tiere, die vom 1. Tage an mit Präp. 11 behandelt worden sind, ganz in der Nähe. Die Wirkung ist indessen schwächer bei denjenigen Tieren, bei welchen die Behandlung 7 Tage nach der Infektion begonnen wurde. Besonders mit Bezug auf die Milz kann man beobachten, dass der Gehalt an Tuberkelbazillen erheblich geringer bei den mit Präp. 10 und 11 behandelten Tieren als bei den Kontrollen ist, was darauf hindeutet, dass die hämatogene Ausstreuung weniger intensiv ist. Auf dieses Verhalten kommen wir später noch zurück, wenn wir die Versuche, in denen die Tiere durch Inhalation infiziert wurden, besprochen haben.

In Tabelle 5 ist das makroskopische Sektionsergebnis wiedergegeben. Auch hier scheint Präp. 10 die beste Wirkung zu zeigen. So hatten alle 7 Kontrolltiere, 1 von 4 mit Präp. 10 behandelten, 8 von 13 mit Präp. 11 behandelten, 3 von 4 mit Sulfapyridin behandelten und 1 von 2 mit Präp. 18 behandelten Tieren Knötchen in der Milz; zugleich waren die regionären Drüsen und die Leberpfortendrüsen bei den mit Präp. 10 und 11 behandelten Tieren durchgängig beträchtlich kleiner als bei den Kontrollen.

Da es sich gezeigt hatte, dass Präp. 10 in diesem Versuche die beste Wirkung hatte, führten wir einen ähnlichen Versuch aus, in dem wir den Hauptwert auf die Behandlung mit diesem Präparat legten.

## Versuch 2.

Die Behandlung wurde in verschiedener Weise variiert:

- 1 Gruppe Tiere wurde vom 1. Tage an behandelt mit 500 mg pr. kg  
2mal täglich.
- 1 Gruppe Tiere wurde vom 1. Tage an behandelt mit 330 mg pr. kg  
2mal täglich.

Da es sich indessen erwies, dass die Tiere die grosse Dosis nur kurze Zeit ertrugen, wurden die beiden Gruppen zusammengelegt und alle Tiere erhielten 330 mg pr. kg 2mal täglich. Da wir hierdurch zu viele behandelte Tiere im Verhältnis zu den Kontrollen

bekamen, begannen wir nach Verlauf von 53 Tagen bei einigen von ihnen zugleich auch eine Behandlung mit Solganal, bei anderen aus später noch zu besprechenden Gründen eine Behandlung mit Injektion von 1/100 mg BCG jeden 4. Tag. Diese Tiere zeigten indessen keinen nennenswerten Unterschied von den ausschliesslich mit Präp. 10 behandelten und werden deshalb auch nicht näher besprochen, sondern in einer Gruppe zusammengestellt.

Schliesslich haben wir 1 Gruppe von Tieren, die mit Präp. 11 vom 1. Tage an behandelt wurden, und zwar mit 500 mg pr. kg 2mal täglich. Auch in diesem Versuche trafen eine Anzahl Todesfälle ein, nicht so sehr infolge der Behandlung als infolge anderer Infektionen.

Von 10 Kontrollen verendeten 5 vom 30. bis zum 176. Tage.

Von 40 mit Präp. 10 behandelten Tieren starben 23 vom 12. bis zum 180. Tage; besonders die ausserdem mit Solganal behandelten Tiere zeigten eine grosse Sterblichkeit, wahrscheinlich weil die angewandte Dosis zu gross war.

Von 10 mit Präp. 11 behandelten Tieren gingen 5 vom 17. bis zum 130. Tage ein.

Da die meisten Tiere, wie erwähnt, an anderen Infektionen oder Unglücksfällen während der Behandlung starben, sind sie nicht in der Aufstellung mitangeführt.

Schliesslich lebten am Ende des Versuches noch 1 Kontrolltier und 5 mit Präp. 10 behandelte Tiere. Alle 6 Tiere zeigten eine mehr oder weniger ausgedehnte, chronische, generalisierte Tuberkulose; aber da wir nur 1 Kontrolltier zum Vergleich hatten, können wir bloss sagen, dass die Behandlung auf jeden Fall nicht kurativ gewesen ist. Die Behandlung wurde 3 Monate nach der Infektion abgeschlossen.

Das Ergebnis dieser Versuchsserie war ganz dasselbe wie in dem vorhergehenden Versuche, weswegen wir uns damit begnügt haben, die Hauptzüge in Tabelle 6 und 7 wiederzugeben und dort die Durchschnittszahlen anzuführen.

Schliesslich wurden in einigen kleineren Versuchen die 3 Sulfathiodiazole (Präp. 18, 16 und 22) untersucht. Diese 3 Stoffe zeigten ungefähr dieselbe Wirkung, die am besten bei Präp. 18 und etwa schwächer als die des Sulfathiazols war.

Das Auffälligste bei diesen Versuchen war besonders die hemmende Wirkung des Sulfamethylthiazols auf die Entwicklung der tuberkulösen Prozesse; man kann nun die Frage

Subkutaner Versuch 2. 30-10-1941.

92.

Tabelle 7.

Subkutaner Versuch 2. 30-10-1941.

Getötet Tag	Meerschweinchen	Behandlung	mg%	Sektion		
				Reg. Drüse	Leberpf.	Milz
72.	210	Kontrolle		37	13	15 submiliare Knötchen
	209	Kontrolle		30	10	Zahlr. bis zu hanfsamengrosse Knötchen
	160	Pr. 10.-1. Tag	5,0	19	9	2 hanfsamengrosse Knötchen
	162	» » »	7,2	9	12	0 Knötchen
	173	» » »		8	7	1 miliumgrosses Knötchen
	181	Pr. 10.-6. Tag	5,3	13	9	0 Knötchen
	185	» » »	7,7	11	6	0 Knötchen
	200	Pr. 11.-1. Tag	3,1	8	7	0 Knötchen
	201	» » »	3,8	16	17	7 bis zu miliumgrosse Knötchen
92.	211	Kontrolle		18	12	4 miliumgrosse Knötchen
	213	Kontrolle		20	12	Zahlr. bis zu hanfsamengrosse Knötchen
	164	Pr. 10.-1. Tag		12	8	1 hanfsamengrosse Knötchen
	170	» » »		12	10	3 hanfsamengrosse Knötchen
	172	» » »		12	8	0 Knötchen
	175	» » »		8	5	0 Knötchen
	179	Pr. 10.-6. Tag		18	12	2 hanfsamengrosse Knötchen
	188	» » »		11	8	0 Knötchen
	196	» » »		12	9	0 Knötchen
	199	Pr. 11.-1. Tag		18	12	0 Knötchen
	202	» » »		17	12	18 bis zu hanfsamengrosse Knötchen
	206	» » »		15	12	0 Knötchen

stellen, ob das ein Zeichen dafür ist, dass die Behandlung günstig war.

Eine solche rein makroskopische Messung der Grösse der tuberkulösen Prozesse kann nämlich nicht ganz so wenige ernste Fehlerquellen aufweisen. In früheren Versuchen hat der eine von uns zusammen mit *Bindslev*\*) gezeigt, dass Meer-

\*) noch nicht veröffentlicht.

schweinchen, die mit einer an sämtlichen Vitaminen insuffizienten Kost ernährt worden waren, eine tuberkulöse Infektion auf ganz andere Weise beantworteten als normal ernährte Meerschweinchen. So zeigte es sich, dass die tuberkulösen Prozesse eine weit geringere Entwicklung bekamen, und bei einer rein makroskopischen Betrachtung solcher Versuche konnte man leicht die ganz falsche Auffassung erhalten, dass die unzureichend ernährten Meerschweinchen mehr resistent gegenüber der tuberkulösen Infektion waren als die normal ernährten.

Nahm man indessen eine histologische Untersuchung der Prozesse oder eine Aussaat vor, so erhielt man ein ganz anderes Bild. Während die kleinen Knötchen bei den unzureichend ernährten Meerschweinchen von T. B. wimmelten, waren die grossen Prozesse bei den normal ernährten Tieren weit bakterienärmer. Das lässt sich nur in der Weise deuten, dass sowohl die natürliche als auch die erworbene Resistenz des Organismus infolge der unzureichenden Ernährung beträchtlich herabgesetzt war. Hierdurch erklären sich sowohl die weniger ausgesprochenen Zellreaktionen (kleinere makroskopisch sichtbare Prozesse) als auch die fortgesetzte Bakterienvermehrung. Diese Versuche zeigten ausserdem, dass die Tiere mit unzureichender Ernährung eine herabgesetzte Tuberkulinempfindlichkeit hatten.

Etwas Ähnliches lässt sich auch aus den von *Bindsvlev* ausgeführten Desensibilisierungsversuchen ableiten. Indem er eine kräftige Desensibilisierung von tuberkulinpositiven Versuchstieren vornahm, gelang es ihm, die positive Tuberkulinreaktion aufzuheben. Dieses Resultat liess sich nur erzielen, wenn grosse Dosen von gereinigtem Tuberkulin, und nicht von Alt-Tuberkulin, angewandt wurden. Diese Tiere (die nicht infolge der Desensibilisierung geschwächt waren) zeigten das interessante Verhalten, dass keine ausgedehnten Zellreaktionen entstanden, wie wir sie sonst bei allergischen Tieren kurz nach der Infektion sehen. Ganz im Gegenteil vermehrten sich die eingeatmeten Tuberkelbazillen wie bei einem nicht-allergischen Tiere, ohne dass es zu irgendeiner Zellreaktion kam.

Dieser Versuch weist in die gleiche Richtung wie der Versuch mit unzureichender Kost, und hier ist es so auffallend deutlich, dass, wenn man die Überempfindlichkeit gegen die Giftstoffe des Tuberkelbazillus aufhebt, zugleich auch die Immunität des Organismus herabgesetzt wird.

Wie wir bereits vorher erwähnt haben, macht sich das gleiche in der kachektischen Phase der Tuberkuloseentwicklung geltend; das besagt also, dass eine geringe Entwicklung der tuberkulösen Prozesse nicht gleichbedeutend damit zu sein braucht, dass diese Tiere günstiger gestellt sind als die Tiere mit kräftig entwickelten Prozessen. In den vorausgehenden Versuchen zeigte sich indessen, dass mehr T. B. in den Prozessen bei den nicht behandelten Kontrolltieren vorkamen, weshalb man vielleicht diese Sorgen für überflüssig halten könnte.

Aber es kann natürlich sein, dass hier beides gleichzeitig vorliegt, nämlich sowohl eine günstige Wirkung des Stoffes, welche die geringere Anzahl der T. B. zur Folge hatte, als auch eine schädliche Wirkung auf den Organismus, die sich in einer Schwächung der natürlichen Verteidigungsmassnahmen desselben äusserte, sodass gerade die Kenntnis hiervon uns die rechten Richtlinien für die Auswahl wirksamer Stoffe geben könnte.

Um uns einen Begriff davon machen zu können, ob so etwas der Fall war, untersuchten wir ganz natürlich die Tuberkulinreaktion bei den in der vorhergehenden Versuchsserie besprochenen Tieren. 35 und 82 Tage nach der Infektion wurde eine intrakutane Tuberkulinprobe an sämtlichen Tieren mit 1/1000 mg gereinigtem Tuberkulin ausgeführt.

Das Ergebnis geht aus Tabelle 8 hervor, welche zeigt, dass insbesondere Präp. 10 eine beträchtliche Herabsetzung oder sogar eine Aufhebung der Tuberkulinüberempfindlichkeit mit 1/1000 mg gereinigtem Tuberkulin gibt, während Präp. 11 eine etwas geringere Wirkung auf die Tuberkulinüberempfindlichkeit hatte. Dieses Phänomen war erheblich stärker ausgeprägt, wenn die Reaktion am 35. Tage als wenn sie am 82. Tage ausgeführt wurde; d. h. dass man, ebenso wie es in

Tabelle 8.

$\frac{1}{1000}$ mg gereinigtes Tuberkulin															
Tuberkulinprobe 35 Tage nach der Infektion								Tuberkulinprobe 82 Tage nach der Infektion							
Kontrol- len		Präp. 10 beg. 1. Tag		Präp. 10 beg. 6. Tag		Präp. 11 beg. 1. Tag		Kontrol- len		Präp. 10 beg. 1. Tag		Präp. 10 beg. 6. Tag		Präp. 11 beg. 1. Tag	
24 St.	48 St.	24 St.	48 St.	24 St.	48 St.	24 St.	48 St.	24 St.	48 St.	24 St.	48 St.	24 St.	48 St.	24 St.	48 St.
17	15	13	0	14	10	14	9			22	18	23	19	19	15
16	12	15	6	15	12	16	12					28	24		
23	25	0	0	14	12	14	0			18	15				
22	22	0	0	0	0	11	6	26	22					22	21
21	21	10	0	0	0	12	0	25	24					25	19
20	21	0	0	0	0	0	0	29	25	21	17				
22	17	0	0	0	0	15	11	26	27			14	0	21	17
19	17	0	0	0	12	14	10	26	23	15	12	22	16	20	18
22	16	10	0	0	0			26	23	10	0				
		13	8	0	0										
		0	0	13	10					23	22				
		0	0	11	0					24	20				
		0	0	0	0										
		10	0	0	0					19	17	0	0		
		10	0	15	10					11	10	16	15		
		0	0	0	0							0	0		
		9	8	0	0					0	0	22	21		
		0	0	16	13					22	17	21	16		
		14	10							14	18				

Bindstev's Versuchen der Fall war, auf die Dauer die Tuberkulinüberempfindlichkeit nicht niederhalten konnte. Wir haben keine Erklärung für dieses Phänomen. Dass es nicht auf die geringere Zahl von Tuberkelbazillen bei den behandelten Tieren zurückzuführen ist, geht aus folgendem Versuche hervor:

Eine Anzahl Versuchstiere, die eine chronische Tuberkulose infolge einer mehrere Monate vorher vorgenommenen Infektion hat-



Tabelle 9.  
Kontrollen.

M 5158				M 5151				M 5169				M 5160			
1. Tub. pr.		3 Tage später		1. Tub.pr.	3 Tage später		1. Tub.pr.	3 Tage später		1. Tub.pr.	3 Tage später		1. Tub.pr.	3 Tage später	
$\frac{1}{1000}$		$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$
24 St. 20(10)		30(10)	21(7,5)	15	16	7,5	25(9)	16	25(9)	21	17	12	15	18	21
48 St. 15(10)		18(10)	16(8,5)	8	15(5,5)	12(7,5)	24(10)	15(5,5)	24(10)	16(10)	13(9)	7	12	17	10
															Mrk.

Präp. 10. 300 mg 2mal täglich.

M 886 (4,6)				M 885 (2,5)				M 5151 (3,2)				M 888 (5,2)			
Vor Beh.		Nach 3 tägiger Beh.		Vor Beh.	Nach 3 tägiger Beh.		Vor Beh.	Nach 3 tägiger Beh.		Vor Beh.	Nach 3 tägiger Beh.		Vor Beh.	Nach 3 tägiger Beh.	
$\frac{1}{1000}$		$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$
24 St. 20(10)		Zusammenfließendes Oedem		25(8)	19	14	10	10	14	Zusammenfließendes Oedem		Zusammenfließendes Oedem		Zusammenfließendes Oedem	
48 St. 20(10)				23(11)	10	7	6	14	14			20(9)		28(12)	

Präp. 10. 150 mg 2mal täglich.

M 5155 (2,2)				M 5154 (2,3)				M 5183 (2,2)				M 901 (3,2)			
Vor Beh.		Nach 3 tägiger Beh.		Vor Beh.	Nach 3 tägiger Beh.		Vor Beh.	Nach 3 tägiger Beh.		Vor Beh.	Nach 3 tägiger Beh.		Vor Beh.	Nach 3 tägiger Beh.	
$\frac{1}{1000}$		$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{3000}$	$\frac{1}{1000}$
24 St. 21(6)		14 Oedem		16	11	10	8	30(13)	14	16	14	12	12	Mrk.	Mrk.
48 St. 25(12)		7 Oedem		14	Mrk.	Mrk.	Mrk.	30(13)	10	12	8	10	10	0	0

M 5191				M 5166				M 5201			
1. Tub. pr.		7 Tage später		1. Tub.pr.		7 Tage später		1. Tub.pr.		7 Tage später	
$1/1000$	$1/1000$	$1/3000$	$1/6000$	$1/1000$	$1/500$	$1/1500$	$1/3000$	$1/1000$	$1/500$	$1/1500$	$1/3000$
24 St. 23(5)	20	13	10	16	20(5)	20	15	18(4)	21(7)	14	14(2)
48 St. 22(7)	15	12	9	15	19	14	10	15(5,5)	19(8)	11	10

Präp. 10. 300 mg 2mal täglich.

M 5153 (5,9)				M 5152 (7,0)				M 5156 (5,5)			
Vor Beh.		Nach 7 tägiger Beh.		Vor Beh.		Nach 7 tägiger Beh.		Vor Beh.		Nach 7 tägiger Beh.	
$1/1000$	$1/1000$	$1/3000$	$1/6000$	$1/1000$	$1/1000$	$1/3000$	$1/6000$	$1/1000$	$1/500$	$1/1500$	$1/3000$
24 St. 25(7)	10	7	4	17(6)	10	Mrk.	0	15	10	Mrk.	0
48 St. 28(12)	10	7	4	18(10)	10	0	0	14	0	0	0

Präp. 10. 150 mg 2mal täglich.

M 5157 (5,7)				M 5161 (5,7)				M 5213 (3,3)			
Vor Beh.		Nach 7 tägiger Beh.		Vor Beh.		Nach 7 tägiger Beh.		Vor Beh.		Nach 7 tägiger Beh.	
$1/1000$	$1/1000$	$1/3000$	$1/6000$	$1/1000$	$1/1000$	$1/3000$	$1/6000$	$1/1000$	$1/500$	$1/1500$	$1/3000$
24 St. 25(3)	10	Mrk.	Mrk.	20(5)	0	0	0	12	10	10	Mrk.
48 St. 22	0	0	0	23(5,5)	0	0	0	13(11)	8	7	Mrk.

Präp. 10. 75 mg 2mal täglich.

M 5162 (4,0)				M 5173 (3,5)				M 5172 (3,6)				M 5204 (3,1)			
Vor Beh.		Nach 7 tägiger Beh.		Vor Beh.		Nach 7 tägiger Beh.		Vor Beh.		Nach 7 tägiger Beh.		Vor Beh.		Nach 7 tägiger Beh.	
$1/1000$	$1/1000$	$1/3000$	$1/6000$	$1/1000$	$1/1000$	$1/3000$	$1/6000$	$1/1000$	$1/1000$	$1/3000$	$1/6000$	$1/1000$	$1/500$	$1/1500$	$1/3000$
24 St. 23(6)	14	11	7	24(7,5)	15	12	8	20	15	9	10	15	10	9	Mrk.
48 St. 19(11)	15	11	6	24(8,5)	14	12	9	20(5)	14	8	8	15	12	7	5

ten, wurden mit 1/1000 mg gereinigtem Tuberkulin geprüft und zeigten alle eine kräftige Reaktion. Einige der Tiere wurden mit Präp. 10, 300 mg 2mal täglich, behandelt, andere mit 150 mg und wieder andere mit 75 mg 2mal täglich. 3 Tage nach Behandlungsbeginn wurde bei der Hälfte der Kontrolltiere und der Hälfte der behandelten Tiere, mit Ausnahme derjenigen, die nur 75 mg 2mal täglich bekommen hatten, eine graduierte Tuberkulinreaktion mit gereinigtem Tuberkulin vorgenommen. Bei den Tieren, die bei der ersten orientierenden Tuberkulinprobe mit 1/1000 mg eine etwas schwächere Tuberkulinempfindlichkeit gezeigt hatten, wurden 1/500—1/1500 und 1/3000 mg angewandt, während bei den übrigen Tieren 1/1000—1/3000 und 1/9000 mg zur Anwendung kamen.

Das Ergebnis ist aus Tabelle 9 zu ersehen. Die Zahlen geben den Diameter der Reaktion an, die Zahlen in Klammer den Diameter der Nekrose.

Es geht hieraus hervor, dass bereits nach dreitägiger Behandlung eine Änderung der Tuberkulinempfindlichkeit eingetreten war. Es war bei den mit der grössten Dosis behandelten Tieren unmöglich, irgendeinen Massstab für die Tuberkulinreaktion anzugeben, da sämtliche Injektionsstellen zu einer grossen ödematösen Partie, deren Aussehen beträchtlich von dem der üblichen Tuberkulinreaktion abwich, verschmolzen waren.

Während man bei einer Tuberkulinreaktion gewöhnlich nach 24 und 48 Stunden eine recht gut abgegrenzte feste Infiltration und eine kräftige Hyperämie, die sich über deren Grenze hinaus erstreckt, vorfindet, sowie evtl. eine zentrale Nekrose, war bei den behandelten Tieren nur ein gelatinöses Oedem ohne nennenswerte Rötungsreaktion und ohne Nekrose zu sehen. Diese Form von Reaktion wies im ganzen genommen eine grosse Ähnlichkeit damit auf, was wir bei den behandelten Tieren in der erwähnten Periode vom 8. bis 14. Tage beobachtet hatten (s. S. 156). Bei den mit einer kleineren Dosis von Präp. 10 behandelten Tieren war dieses Phänomen nur schwach ausgesprochen, und wir fanden hier eine erheblich herabgesetzte Überempfindlichkeit.

An den übrigen Tieren wurde 7 Tage nach Behandlungsbeginn eine ähnliche graduierte Reaktion ausgeführt; aus der Tabelle geht hervor, dass besonders bei den Tieren, welche mit

300 mg und 150 mg 2mal täglich behandelt worden waren, die Tuberkulinempfindlichkeit so gut wie verschwunden, bei den mit 75 mg behandelten Tieren dagegen erheblich herabgesetzt war.

Zugleich mit der Ausführung der Tuberkulinprobe wurde eine Bestimmung des Gehaltes des Blutes an freiem Sulfamethylthiazol vorgenommen, wobei sich zeigte, dass selbst ein so geringes mg % wie von 2,2 bis zu 3,2 (Behandlung der Tiere mit 150 mg 2mal täglich und Tuberkulinprobe 3 Tage nach Behandlungsbeginn) eine beträchtliche Herabsetzung der Tuberkulinempfindlichkeit bewirkte.

Da die wachstumshemmende oder tötende Wirkung dieses Stoffes nach unseren Erfahrungen erst bei einer Blutkonzentration von 5 mg % aufwärts eintritt, ist es zu verstehen, dass man zur Erlangung einer günstigen Wirkung der Behandlung so grosse Dosen geben muss, dass man auf dem schnellstmöglichen Wege diese Konzentration erreicht, und es ist auch zu verstehen, dass die Wirkung am ausgesprochensten in der präallergischen Phase ist. Bei einer schwächeren Konzentration wird die Überempfindlichkeit und dadurch sicherlich auch die Immunitätswirkung abgeschwächt oder aufgehoben.

Es sei fernerhin kurz angeführt, dass wir mittels intraperitonealer Einspritzung passender Dosen gereinigten Tuberkulins untersucht haben, ob die Behandlung den Tuberkulinschock aufzuheben vermochte. Von einer vollständigen Aufhebung des Schockes war nicht die Rede; aber es blieben doch mehr von den behandelten Tieren am Leben als von den Kontrollen, und der Schock trat auch in einem späteren Zeitpunkte ein. Die zu unserer Verfügung stehende Zahl von Tieren war indessen zu klein, als dass wir entscheidendes Gewicht auf dieses Verhalten legen konnten.

Von einem biologischen Standpunkte aus ist dieses Phänomen, dass man die Tuberkulinüberempfindlichkeit durch parenterale Behandlung mit diesen Stoffen aufheben kann, von grösstem Interesse.

Hiermit können wir also noch ein Beispiel dafür geben, dass eine Aufhebung der Tuberkulinempfindlichkeit von einer

Herabsetzung der Immunität begleitet ist. Die übrigen Beispiele haben wir in 1) der Desensibilisierung, 2) der unzureichenden Ernährung, 3) der Kachexie.

Worauf dieses Phänomen eigentlich beruht, dafür können wir im augenblicklichen Zeitpunkte keine Erklärung geben. Es scheint spezifisch an die tuberkulöse Infektion gebunden zu sein. *Bing* hat nämlich versucht, ob man mit einer ähnlichen Behandlung von mit Pferdeserum sensibilisierten Meerschweinchen mit Präp. 10 das Arthus' Pränamen aufheben könnte. Die Meerschweinchen wurden teils von dem Zeitpunkte an behandelt, an dem die Sensibilisierung begonnen wurde, teils 8 Tage, bevor die Arthus' Probe ausgeführt wurde. In keinem Falle gab es eine Abschwächung des Arthus' Phänomens im Vergleich zu nicht-behandelten Kontrolltieren.

*Bing* hat ebenfalls das Blutbild bei teils tuberkulösen, teils nicht-tuberkulösen, längere Zeit hindurch mit Präp. 10 behandelten Meerschweinchen untersucht. Es wurde keine Änderung im Blutbilde nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass die erwähnte Wirkung nicht auf einer unspezifischen Herabsetzung der Abwehrreaktion des Organismus beruht. Das Problem ist jedoch bei weitem noch nicht durchuntersucht.

Diese Versuche zeigen also, dass die Behandlung mit diesen Stoffen die Überempfindlichkeit gegen Tuberkelbazillen herabsetzt, und dass das höchstwahrscheinlich eine der Ursachen der geringen Entwicklung der tuberkulösen Prozesse ist, in gleicher Weise, wie wir es bei den tuberkulindesensibilisierten Tieren gesehen haben. Ausserdem hat es sich erwiesen, dass eine erheblich geringere Konzentration des Stoffes im Blute notwendig ist, um die Überempfindlichkeit des Organismus gegen Tuberkelbazillen und hierdurch möglicherweise auch seine Immunität herabzusetzen, als die Menge, die zur Hemmung oder Tötung der Tuberkelbazillen erfordert wird.

Wir haben hier offensichtlich das Problem vor uns, dem *Ehrlich* gegenüberstand, und mit dem alle, die sich mit Chemotherapie beschäftigen, zu tun haben, nämlich der Relation zwischen der Parasitotropie und der Organotropie.

Die bisher ausgeführten Versuche konnten uns indessen keine weitere Aufklärung über diese Verhältnisse geben, wes-

halb wir unsere alte, erprobte Technik in Benutzung nahmen, welche bei so vielen früheren Gelegenheiten uns Aufschlüsse über den Verlauf der Tuberkulose unter verschiedenen Bedingungen gegeben hat, — Aufschlüsse, welche wir auf andere Weise nicht hätten erhalten können.

Diese Versuchstechnik besteht darin, dass wir die Versuchstiere eine so fein versprühte Emulsion von Tuberkelbazillen einatmen lassen, dass jedes Tröpfchen nur einen einzigen oder höchstens vereinzelte T.B. enthält. Die Tiere werden in verschiedenen Zeitabständen getötet; wie weiter oben beschrieben, werden quantitative Aussaaten aus Lunge und Milz vorgenommen sowie histologische Untersuchungen von Präparaten, die sowohl mit Zellenfärbung als auch mit T.B.-Färbung behandelt sind, um hierdurch eine genauere Kenntnis über die Wechselwirkung zwischen dem Organismus und den Tuberkelbazillen und über den Einfluss der Behandlung auf diese Wechselwirkung zu erhalten.

Insgesamt sind 4 derartige Versuche ausgeführt worden, deren Resultat wir hier kurz besprechen wollen.

In sämtlichen Inhalationsversuchen verstehen wir unter Behandlung in der üblichen Weise eine subkutane Injektion des in Gummisalzlösung emulgierten Stoffes in einer Dosis von 333 bis zu 500 mg pr. kg Meerschweinchengewicht 2mal täglich. Ab und zu sind kleine Pausen in dieser Behandlung vorgekommen.

Zuerst möchten wir rein schematisch in Fig. 1 das Hauptprinzip in der Entwicklung der Prozesse zeigen, wie es mit Hilfe der histologischen Untersuchung herausgefunden wurde. Die Entwicklung der Prozesse bei dem Kontrolltiere ist schon vorher beschrieben worden. Bei den mit Präp. 10 behandelten Tieren trat die Zellreaktion weit später ein und war weit weniger ausgesprochen als bei den Kontrollen. Sie bestand hauptsächlich aus grossen mononukleären Zellen, und es gab keine oder nur wenige polynukleäre Leukozyten.

Bei der späteren Entwicklung des Prozesses war es daher auch selten, dass es zu Abszessen oder Nekrose kam, und die Prozesse waren von einer mehr interstitiellen als pneumonischen Natur. Ausserdem gab es eine beträchtliche Hemmung

Tabelle

Inhalationsversuch 1.

Präp. 10 (Sulfamethylthiazol) subk. in

Getötet Tag	Behandlung	Meerschweinchen	mg %	Aussaat						
				Lunge				Milz		
				unv.	1/10	1/100	1/1000	unv.	1/10	1/100
12.	Kontrolle	428		∞	∞	147		27		
	Präp. 10	402	8,22	∞	∞	111		1,1		
14.	Kontrolle	425		∞	∞	∞	34	5,5	0,5	0
	Präp. 10	403	8,0	∞	∞	93	11,6	5	0,5	0
16.	Kontrolle	426		∞	∞	127	16,3	∞	156	18
	Präp. 10	404	7,3	∞	∞	44	2,5	6	0	0
16.	Kontrolle	427		∞	∞	∞	48	∞	67	6
	Präp. 10	405	6,8	∞	∞	∞	51	3	0,2	0
18.	Kontrolle	421		∞	∞	∞	65	∞	40	6,3
	Präp. 10	S 406	6,98	∞	∞	97	12	4,7	0,5	0
19.	Kontrolle	424		∞	∞	∞	38	∞	33	3,5
	Präp. 10	407	8,42	∞	∞	∞	63	9	0,2	0

des Bakterienwachstums in den ersten 14—24 Tagen der Infektion. In dieser Periode zeigten die Tuberkelbazillen Anzeichen eines Zerfalles. So fanden wir oft, wie auch aus Fig. 1 hervorgeht, Zellen mit vereinzelt homogenen und zahlreichen stark segmentierten und gekörnelten Tuberkelbazillen. Fernerhin wurden Bruchstücke und Brocken sowie ganz schwache säurefeste Tuberkelbazillen gefunden, welche wie Schatten im Präparate lagen. Sehen wir uns indessen die tu-

10.

10-9-1941. 1570.

Gummisalzlösung 2mal täglich.

Bronch. dr.	Sektion	
	Lunge	Milz
0	0 Knötchen.	0
0	0 Knötchen.	6mal nat. Gr. 0 Knötchen.
doppelt hanfsamengross	Eine Anzahl bis zu $\frac{1}{2}$ mm grosse Knötchen.	3mal nat. Gr. 0 Knötchen.
»	0	5mal nat. Gr. 0 Knötchen.
gut erbsengross	Unzählige bis zu $\frac{3}{4}$ mm grosse Knötchen.	0
gut hanfsamen- gross	Angedeutete Knötchen < $\frac{1}{4}$ mm.	0
knapp nusskern- gross	Zahlr. teils konfluier. bis zu $\frac{3}{4}$ mm grosse Knötchen.	0
gut hanfsamen- gross	Eine Anzahl $\frac{1}{4}$ mm grosse Knötchen.	6mal nat. Gr. 0 Knötchen.
gut nusskern- gross	Unzählige $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ mm gros- se Knötchen.	3mal nat. Gr. 0 Knötchen.
0	0 Knötchen.	0
nusskerngross	Unzählige 1—2 mm grosse Knötchen.	Ein knapp miliumgrosses Knötchen.
doppelt hanfsamengross	Eine Anzahl $\frac{3}{4}$ —1 mm grosse Knötchen.	0

berkulösen Prozesse zu einem späteren Zeitpunkte an, z. B. 24—36 Tage nach der Infektion, so kann man wahrnehmen, dass die Kontrolltiere dank der entstandenen Immunität imstande gewesen sind, die Vermehrung der Tuberkelbazillen zu hemmen oder sogar einen Teil von ihnen zu töten, sodass ihre Anzahl nicht vergrössert, sondern eher vermindert worden ist.

Dagegen kann man bei den behandelten Tieren beobach-



Tabelle  
Inhalationsversuch 2.  
Präp. 10. 1) subk. 2mal.

Getötet Tag	Behandlung	mg%	Aussaat						
			Lunge				Milz		
			1/10	1/100	1/1000	1/10,000	unv.	1/10	1/100
10.	Kontrolle		∞	134	16		ca. 200		
	Präp. 10	5,45	ca. 200	29	3		3		
	Präp. 10 + Inhal.	6,03	ca. 300	35	2,7		3,2		
12.	Kontrolle		∞	∞	88	15	ca. 200	24	
	Kontrolle		∞	300	27	2,5	55	6	
	Präp. 10	7,25	∞	71	9	1,5	2	0	
	Präp. 10		∞	ca. 200	19	3,5	2	0	
	Präp. 10 + Inhal.		∞	ca. 150	14	3	2,3	0,6	
	Präp. 10 + Inhal.	7,07	∞	ca. 150	19	2,5	3,5	0,3	
14.	Kontrolle		∞	∞	66	6,5	∞	60	7,3
	Präp. 10	8,80	∞	83	10	1,5	20	1,7	0,3
	Präp. 10 + Inhal.	6,85	∞	101	11	1	7,6	0,5	0
16.	Kontrolle		∞	∞	ca. 200	23	ca. 200	22	3,3
	Kontrolle		∞	∞	97	9,5	∞	105	11
	Präp. 10	9,50	∞	∞	66	10	7	0,7	0
	Präp. 10	11,68	∞	75	8,7	2	19	1,2	0
	Präp. 10 + Inhal.	8,38	∞	∞	39	4,5	32	2	0
	Präp. 10 + Inh.	7,80	∞	∞	39	5,5	44	3	0
19.	Kontrolle		∞	∞	118	14	∞	135	9,6
	Präp. 10	8,45	∞	∞	36	4,5	11	1	0
	Präp. 10 + Inhal.	6,20	∞	ca. 300	29	4	93	8	1

11.

22-10-1941. 1570.

2) subk. + Inhalation 2mal.

## Sektion

Bronch. dr.	Lunge	Milz
doppelt hanfsamengross	Eine Anzahl gerade noch sichtb. Knötchen.	0 Knötchen.
doppelt hanfsamengross	0	0 Knötchen.
doppelt hanfsamengross	0	0 Knötchen.
gut erbsengross	Eine Anzahl kleine Knötchen.	0 Knötchen.
nusskerngross	Eine Anzahl Knötchen, einige zusammenfliessend.	0 Knötchen.
doppelt hanfsamengross	0	0 Knötchen.
doppelt hanfsamengross	0 Knötchen.	0 Knötchen.
doppelt hanfsamengross	0 Knötchen.	0 Knötchen.
erbsengross	Eine Anzahl submiliare Knötchen.	0 Knötchen.
gut erbsengross	Unzählige submiliare Knötchen.	0 Knötchen.
doppelt hanfsamengross	0	0 Knötchen.
doppelt hanfsamengross	Andeutung von Knötchen.	0 Knötchen.
nusskerngross	Unzählige zum Teil zusammenfliessende submiliare Knötchen.	0 Knötchen.
nussgross	Zusammenfliessende submiliare Knötchen.	Beginnende Knötchenbildung.
erbsengross	Eine Anzahl gerade noch sichtb. Knötchen.	0 Knötchen.
doppelt hanfsamengross	Eine Anzahl gerade noch sichtb. Knötchen.	0 Knötchen.
doppelt hanfsamengross	Eine Anzahl gerade noch sichtb. Knötchen.	0 Knötchen.
doppelt hanfsamengross	Eine Anzahl gerade noch sichtb. Knötchen.	0 Knötchen.
nussgross	Grosse zusammenfliessende Knoten.	Beginnende Knötchenbildung.
erbsengross	Unzählige submiliare Knötchen.	0 Knötchen.
erbsengross	Unzählige submiliare Knötchen, teils zusammenfliessend.	0 Knötchen.

Tabelle 12.

Inhalationsversuch 3. 3-12-1941. 1570.  
 Präp. 10 begonnen 1., 10. und 26. Tag. — Präp. 11 begonnen 1. Tag  
 nach subk. Injektion in Gummisalzlösung 2mal täglich.  
 Sulfamethylthiazol (Präp. 10). Sulfathiazol (Präp. 11).

Geleitet Tag	Behandlung	mg%	Aussaat						Sektion		
			Lunge			Milz					
			1/100	1/1000	1/10.000	unv.	1/10	1/100	Bronch. dr.	Lunge	Milz
9.	Kontrolle		3,6	0,3		0		0	Einzelne gerade noch sichtbare Knötchen.	0	
	Pr. 10.-1. Tg.	7,6	2	0		0		0	0 Knötchen.	0	
	Pr. 11.-1. Tg.	4,7	1,6	0,3		0		0	0 Knötchen.	0	
12.	Kontrolle		ca. 150	14	2,5	8,5		erbsengross	Eine Anzahl Knötchen bis zu 1/2 mm.	0	
	Pr. 10.-1. Tg.	7,3	4,3	1,3	0,3	0,4		hanfsamen-gross	0 Knötchen.	0	
	Pr. 11.-1. Tg.	4,8	9	1	0	0,6		>hanfsamen-gross	Andeutung von Knötchen.	0	
14.	Kontrolle		ca. 150	13	1,5	16	0,6	>erbsengross	Zahlr. 1/2 mm grosse Knötchen.	0	
	Pr. 10.-1. Tg.	6,7	26	4	1	2	0,3	doppelt hanf-samen-gross	0 Knötchen.	0	
	Pr. 10.-10. Tg.	5,1	ca. 150	11	2	ca. 100	13	>erbsengross	Einz. kleine Knötchen.	0	
	Pr. 11.-1. Tg.	3,7	26	3	0,3	2	0	doppelt hanf-samen-gross	0 Knötchen.	0	
16.	Kontrolle		∞	39	4,5	ca. 200	20	3,3	nusskerngross	Zahlr. bis zu 1 mm gr. Knötchen.	0
	Pr. 10.-1. Tg.	7,3	19	2,5	0	2,3	0,5	0	hanfsamen-gross	0 Knötchen.	0
	Pr. 10.-10. Tg.	6,1	55	6,3	1	62	7,6	0,6	>erbsengross	Eine Anzahl Knötchen bis zu 3/4 mm.	0
	Pr. 11.-1. Tg.	5,8	74	9,6	1,6	9,6	1	0	>hanfsamen-gross	Andeutung von Knötchen.	0

18.	Kontrolle	112	13	1,6	63	inf.	inf.	nusskerngross	Eine Anzahl Knötchen bis zu 1 mm gr.	0
	Pr. 10.-1. Tg.	6,5	136	2	66	6,7	1,6	doppelt hanf-samengross	Zahlr. bis zu 1 mm gr. Knötchen.	0
	Pr. 10.-10. Tg.	5,5	∞	5,3	22	3,5	0,3	nusskerngross	Unzählige bis zu 1 mm grosse Knötchen.	0
	Pr. 11.-1. Tg.	3,5	∞	3	∞	84	9,5	erbsengross	Eine Anzahl Knötchen bis zu 1 mm.	0
19.	Kontrolle	∞	30	3,6	∞	33	4	nusskerngross	Unzählige 1 mm gr. Knötchen.	0
	Pr. 10.-1. Tg.	8,3	ca. 200	1,6	2,3	0	0	> hanfsamen-gross	Einzelne Knötchen bis zu 1/2 mm.	0
	Pr. 10.-10. Tg.	5,8	ca. 200	2,6	62	6,5	0,6	nusskerngross	Zahlr. bis zu 1 mm gr. Knötchen.	0
	Pr. 11.-1. Tg.	2,0	ca. 200	2,6	29	5,6	0,3	> erbsengross	Zahlr. bis zu 1 mm gr. Knötchen.	0
24.	Kontrolle	∞	50	7	ca. 200	25	3,6	nussgross	Unzählige Knötchen > 1 mm.	0 Knötchen
	Pr. 10.-1. Tg.	9,1	∞	7	ca. 200	30	3	erbsengross	Zahlr. bis zu 1 mm gr. Knötchen.	0 Knötchen
	Pr. 10.-10. Tg.	8,6	∞	3,5	56	6	0,6	nussgross	Eine Anzahl Knötchen bis zu 2 mm.	0 Knötchen
	Pr. 11.-1. Tg.	5,3	∞	49	117	16	1,3	nusskerngross	Unzähl. bis zu 2 mm gr. Knötchen.	0 Knötchen
27.	Kontrolle	∞	25	2,6	44	5,3	0,6	nussgross	Unzählige ca. 2 mm gr. Knötchen.	0 Knötchen
	Pr. 10.-1. Tg.	10,6	106	1	38	5,2	1	nusskerngross	Unzählige ca. 2 mm gr. Knötchen.	0 Knötchen
	Pr. 10.-10. Tg.	6,6	∞	9,6	93	15	1,5	nusskerngross	Unzählige ca. 1 mm gr. Knötchen.	0 Knötchen
	Pr. 11.-1. Tg.	5,3	∞	5,5	9	1,5	0	nusskerngross	Unzählige ca. 1 mm gr. Knötchen.	0 Knötchen
37.	Kontrolle		8,8	1	∞	49	5,6	nusskerngross	Eine Anzahl Knötchen bis zu 3 mm.	Eine Anzahl submil. Knötchen
	Kontrolle		4,6	0,6	68	6	1	nusskerngross	Eine Anzahl Knötchen bis zu 3 mm.	0 Knötchen
	Pr. 10.-26. Tg.	5,5	9	1,6	80	7	0,6	nusskerngross	Unzählige ca. 3 mm gr. Knötchen.	0 Knötchen
	Pr. 10.-26. Tg.	6,2	10	1,1	15	5,5	0	nusskerngross	Unzählige ca. 3 mm gr. Knötchen.	0 Knötchen

Tabelle 13.  
Inhalationsversuch 4.

Getötet Tag	Behandlung	mg%	Aussaat				
			Lunge				
			unv.	1/10	1/100	1/1000	1/10000
11.	Kontrolle		30	2,6	0,6	0	
	Präp. 10 + Pr. 18	5,1	2	0	0	0	
	Präp. 10 abwechs. m. Pr. 18	4,8	8	1	0	0	
	Präp. 18	0,8	25	3	0,2	0	
	Präp. 10	5,8	2,5	0	0	0	
14.	Kontrolle			53	5,6	0,6	0
	Präp. 10 + Pr. 18	4,6		5	0,6	0	0
	Präp. 10 abwechs. m. Pr. 18	4,4		4	0,8	0	0
	Präp. 18	1,2		48	4,8	0,6	0
	Präp. 10	7,5		1,5	0	0	0
18.	Kontrolle			81	8,6	1,6	0,3
	Präp. 10 + Pr. 18	5,0		46	5	1	0
	Präp. 10 abwechs. m. Pr. 18	7,7		6	1	0	0
	Präp. 18	3,4		108	10	1,6	0
	Präp. 10	8,9		9	1,3	0	0
23.	Kontrolle			∞	21	2	0
	Präp. 10 + Pr. 18	4,4		∞	40	4	1
	Präp. 10 abwechs. m. Pr. 18	5,4		13	1	0	0
	Präp. 18 abwechs. m. Pr. 10	3,7		98	7,5	1	0
	Präp. 10	7,3		39	4,6	0,5	0
30.	Kontrolle			∞	28	4,3	0,5
	Präp. 10 + Pr. 18	6,0		∞	24	2,6	0
	Präp. 10 abwechs. m. Pr. 18	8,4		∞	69	9	1
	Präp. 18 abwechs. m. Pr. 10	7,9		ca. 150	15	2,6	0,5
	Präp. 10	8,7		ca. 100	15	2	0

Tabelle 13 (Fortsetzung).  
Inhalationsversuch 4.

Aussaat			Sektion		
Milz			Bronch. dr.	Lunge	Milz
unv.	1/10	1/100			
1,4			doppelt hanf-samengross	0 Knötchen.	0 Knötchen
0			0	0 Knötchen.	0 Knötchen
0			hanfsamen-gross	0 Knötchen.	0 Knötchen
0			doppelt hanf-samengross	0 Knötchen.	0 Knötchen
0			>hanfsamen-gross	0 Knötchen.	0 Knötchen
2,4	0		doppelt hanf-samengross	ca. 20 Knötchen bis zu 1½ mm.	0 Knötchen
0	0		hanfsamen-gross	0 Knötchen.	0 Knötchen
0	0		<doppelt hanf-samengross	Einzelne gerade noch sichtbare Knötchen.	0 Knötchen
0,2	0		hanfsamen-gross	0 Knötchen.	0 Knötchen
0	0		hanfsamen-gross	0 Knötchen.	0 Knötchen
2	0	0	>erbsengross	Eine Anzahl Knötchen bis zu 1 mm.	0 Knötchen
0,2	0	0	hanfsamen-gross	0 Knötchen.	0 Knötchen
0	0	0	hanfsamen-gross	Einzelne Knötchen bis zu 1¼ mm.	0 Knötchen
2,5	0	0	hanfsamen-gross	Einzelne Knötchen bis zu 1¼ mm.	0 Knötchen
0	0	0	>hanfsamen-gross	Einzelne gerade noch sichtbare Knötchen.	0 Knötchen
∞	39	3,6	nusskerngross	ca. 30 Knötchen bis zu 2 mm.	Eine Anzahl subm. Knötchen.
6,3	1	0	doppelt hanf-samengross	ca. 30 Knötchen ¼ bis 1½ mm.	0 Knötchen
0,2	0	0	doppelt hanf-samengross	10 Knötchen bis zu 1½ mm.	0 Knötchen
1,7	0	0	>erbsengross	ca. 30 Knötchen bis zu 1 mm.	0 Knötchen
1,7	0	0	doppelt hanf-samengross	0 Knötchen.	0 Knötchen
21	3	0	>nussgross	ca. 30 Knötchen bis zu 2 mm.	Eine Anzahl subm. Knötchen.
6,5	1,7	0	<nusskern-gross	ca. 20 Knötchen bis zu 2 mm.	0 Knötchen
8	1,3	0	<doppelt hanf-samengross	ca. 20 Knötchen bis zu ¾ mm.	0 Knötchen
3,6	1	0	>nusskern-gross	ca. 20 Knötchen bis zu 2 mm.	0 Knötchen
8	1	0	doppelt hanf-samengross	ca. 15 Knötchen bis zu ¾ mm.	0 Knötchen

ten, dass 18—24 Tage nach der Infektion die hemmende oder tötende Wirkung des Stoffes auf die Tuberkelbazillen gleichsam aufhört. Und wir finden dann, dass der Unterschied zwischen den behandelten Tieren und den Kontrollen sich mehr oder weniger ausgleicht.

Fig. 7 gibt einige Mikrophotographien wieder, welche die Grösse der Zellreaktion bei den unbehandelten und den mit Präp. 10 behandelten Tieren darstellen. Fig. 8 weist ausserdem noch einige Mikrophotographien bei starker Vergrösserung auf.

Aus technischen Gründen war es uns nicht möglich, die Prozesse mit der stärksten Vergrösserung aufzunehmen, so dass man die erwähnte Beeinflussung der Tuberkelbazillen hätte sehen können.

Übrigens ist das besser aus der Zeichnung (Fig. 1) zu sehen.

Schliesslich sei noch angeführt, was die übrigen Untersuchungen in dieser Serie ergeben haben.

Wir wollen uns erst das Resultat der Aussaat ansehen. Aus allen 4 Versuchen geht hervor, dass die Lungen in der ersten Infektionsperiode beträchtlich weniger Tuberkelbazillen bei den behandelten Tieren enthalten. Von ungefähr dem 24. Tage an gleicht sich der Unterschied mehr oder weniger aus. Dieses Verhalten beruht möglicherweise darauf, dass die Bakterien bei den behandelten Tieren infolge des Fehlens einer kräftigen exsudativen Entzündungsreaktion auf der Stelle in den mehr chronischen interstitiellen Prozessen lokalisiert werden, während sie bei den Kontrolltieren zum grossen Teile mit dem Alveoleninhalt durch Hustenstösse emporgebracht werden (man kann wiederholt die kleinen Bronchien bei solchen Kontrolltieren mit einer recht grossen Anzahl von Tuberkelbazillen gefüllt sehen). Dahingegen zeigen die behandelten Tiere, dass die lymphogene und hämatogene Ausbreitung erheblich herabgesetzt ist. Dass die lymphogene Ausbreitung herabgesetzt ist, kann man beobachten, wenn man den Gehalt der Bronchialdrüsen an Tuberkelbazillen untersucht; derselbe macht bei den behandelten Tieren nur einen kleinen Bruchteil des bei den unbehandelten Tieren gefundenen Gehaltes

aus. Dass die hämatogene Ausbreitung herabgesetzt ist, ergibt sich ja eigentlich aus dem voranstehenden, da die Tuberkelbazillen ja erst durch das Lymphsystem dringen müssen, ehe sie die Blutbahn erreichen. Es geht indessen auch aus dem sehr beträchtlichen Unterschiede hervor, welcher bei der Aussaat aus der Milz gefunden worden ist.

In sämtlichen Versuchsserien gibt die Aussaat aus der Milz den sichersten und deutlichsten Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren.

Im übrigen geht auch aus den Tabellen das gleiche hervor wie aus den Mikrophotographien, nämlich dass die Knötchen in den Lungen bei den behandelten Tieren erheblich später eintreten und beträchtlich kleiner verbleiben als bei den Kontrolltieren. Das gleiche gilt ebenfalls von den Bronchiadrüsen und den makroskopisch sichtbaren Prozessen in der Milz.

Es mögen noch einige Einzelheiten bei den Versuchen angeführt werden:

Im Inhalationsversuch 1 (s. Tabelle 10) starben 1 Kontrolltier und 1 behandeltes Tier vor Abschluss des Versuches an anderen Ursachen als Tuberkulose.

Im Inhalationsversuch 2 (s. Tabelle 11) wurden eines der Tiere in der üblichen Weise mit Präparat 10 behandelt, andere 13 Tieren, ausser der subkutanen Behandlung mit Präp. 10, zweimal täglich, eine Inhalation von Präparat 10 in fein pulverisiertem Zustande. In diesem Versuche war die Inhalationsinfektion so kräftig, dass sämtliche Kontrolltiere um den 13. Tag herum sehr kurzatmig wurden und ein Teil von ihnen 15, 15, 15, 16, 19 Tage nach der Infektion an tuberkulöser Pneumonie erstarben. Natürlich war es unmöglich, eine so kräftige Infektion zum Stehen zu bringen, und wir sehen auch, dass einige der mit Präp. 10 behandelten Tiere am bzw. 18., 23., 23., 26. und 31. Tage verstarben.

Diese Verlängerung der Lebensdauer bei den behandelten Tieren ist sicherlich (wie auch aus dem Sektionsbefunde hervorgeht) darauf zurückzuführen, dass die Behandlung die kräftige Zellreaktion gehemmt hat, welche in der Form einer tuberkulösen Pneumonie den Tod der Kontrolltiere infolge von Mangel an respirationsfähigem Lungengewebe hervorrief.

Mit Bezug auf die beiden Behandlungsmethoden zeigte es sich, dass die nur mit der subkutanen Einspritzung behandelten Tiere etwas günstiger abschnitten.



Im Inhalationsversuch 3 (s. Tabelle 12) haben wir die Tiere wie üblich mit Präp. 10 von 1.—10. und vom 26. Tage nach der Infektion an behandelt. Ausserdem wurde eine Gruppe mit Präp. 11 vom 1. Tage an behandelt. Der Grund dafür, dass wir einige Tiere so spät wie am 10. und 26. Tage behandelten, war der, dass wir ausfindig machen wollten, ob die Behandlung wirkte, wenn eine Allergie (bei der am 10. Tage begonnenen Behandlung) und lokale Prozesse (bei der am 26. Tage begonnenen Behandlung) entstanden waren.

Damit die letzteren Tiere eine möglichst leichte Tuberkulose bekommen könnten, sodass die Lebensdauer lang wurde, setzten wir die Inhalationszeit der Tuberkelbazillen herab. Aus diesem Grunde ist eine besondere Gruppe Kontrolltiere mitgenommen worden. Indessen zeigte es sich, dass die Infektion trotz dieser Massnahme doch allzu kräftig geworden war, sodass es bei Beginn der Behandlung am 26. Tage den Tieren infolge ihrer tuberkulösen Infektion sehr schlecht ging. Die Behandlung war deshalb auch ganz wirkungslos, und wir haben daher auch diese Gruppe Tiere und die entsprechenden Kontrolltiere nicht in der Tabelle aufgeführt.

In diesem Versuche starben 3 von 11 Kontrolltieren am 21., 36. und 36. Tage an Tuberkulose, während 2 von den 10 mit Präp. 10 vom 1. Tage an behandelten Tieren am 25. bzw. 32. Tage verendeten. Von den 10 vom 10. Tage an behandelten Tieren gingen 4 am 21., bzw. 21., 29. und 36. Tage ein. Von den 11 mit Präp. 11 behandelten Tieren starben 3 am 20., 33. und 33. Tage.

Im ganzen gesehen zeigt der Versuch, dass die Behandlung vom 1. Tage an mit sowohl Präp. 10 als auch Präp. 11 eine gewisse Wirkung gehabt hat, obschon dieselbe nicht so ausgesprochen wie in den übrigen Versuchen ist, sowie dass die Behandlung vom 10. Tage an kein nennenswertes Resultat gegeben hat.

In Inhalationsversuch 4 (s. Tabelle 13) haben wir von den in den früheren Versuchen gesammelten Erfahrungen aus die Behandlung in verschiedener Weise kombiniert.

Die 1. Gruppe wurde mit der üblichen Dosis von Präp. 10 7 Tage lang behandelt, worauf zu 125 mg Präp. 18, 3mal

täglich 5 Tage lang, übergegangen wurde. Danach wurde von neuem mit Präp. 10 8 Tage lang fortgesetzt, dann mit Präp. 18 4 Tage lang und zum Schluss mit Präp. 10, bis die Tiere getötet wurden. In der Tabelle ist das aufgeführt unter: *Präp. 10 abwechselnd mit Präp. 18.*

Eine zweite Gruppe ist mit einer Mischung von Präp. 10 und Präp. 18 behandelt worden, und zwar im Anfang mit 150 mg von jedem 2mal täglich und später mit 100 mg von jedem ebenfalls 2mal täglich.

Ausserdem sind einige Tiere ausschliesslich mit 200 mg von Präp. 10 2mal täglich wie üblich behandelt worden, während andere Tiere 125 mg von Präp. 18 3mal täglich und vom 18. Tage ab die übliche Dosis von Präp. 10 bekamen.

Von 11 Kontrolltieren starben 5 am 18., bzw. 30., 32., 37. und 66. Tage nach der Infektion — in den meisten Fällen an Tuberkulose, aber auch an interkurrenten Krankheiten, was besonders von den Tieren galt, die früh nach der Infektion eingingen.

Von 10 mit Präp. 10 + 18 behandelten Tieren verendete 1 am 21. Tage infolge einer interkurrenten Erkrankung, und von den 8 abwechselnd mit Präp. 10 und Präp. 18 behandelten Tieren starben 2 am 30. bzw. 47. Tage an Tuberkulose.

Von 6 mit Präp. 10 behandelten und von 6 mit Präp. 18 allein behandelten Tieren starb keins.

Es geht hieraus hervor, dass die Behandlung mit Präp. 10 allein die beste Wirkung zeigte, während die Behandlung mit Präp. 10 + 18 und die wechselweise Behandlung mit Präp. 10 und 18 einen etwas geringeren Effekt hatte.

Die Behandlung mit Präp. 18 allein stand auch in diesem Versuche beträchtlich hinter der mit Präp. 10 zurück. Es ist möglich, dass der Grund hierfür in der niedrigen Blutkonzentration zu suchen ist (am 18. Tage ist dieselbe nur bis auf 3,4 mg % gestiegen); aber da der Stoff *in vitro* eine annähernd viermal so grosse Wirkung hatte als Präp. 10, erscheint es nicht ganz unwahrscheinlich, dass es sich nicht ausschliesslich um eine Frage der Konzentration handelt.

Zum Schluss mag ein Versuch besprochen werden, in welchem wir *Calmette*-vakzinierter und infizierter Meerschweinchen mit Präparat 10 behandelt haben. Alle Tiere sind durch Inhalation eines humanen Stammes infiziert worden. Der Versuch besteht aus 6 Gruppen Meerschweinchen. Gruppe 1 be-

Tabelle 14.

Inhalationsversuch 5. 11-3-1942.

Getölet Tag	Behandlung %	Aussaat										Sektion		
		Lunge					Milz							
		unv.	1/10	1/100	1/1000	1/10000	unv.	1/10	1/100	1/1000	1/10000	unv.	1/10	1/100
7.	Gruppe 2	5,4	0,4				0				erbsengross	Andeutung von Knötchen.	0 Knötchen	
	Gruppe 3	2,4	0,4				0				0	0 Knötchen.	0 Knötchen	
	Gruppe 4	2	0				0				0	0 Knötchen.	0 Knötchen	
12.	Gruppe 1	∞	32	3,6	0	0	3,8				0	0 Knötchen.	0 Knötchen	
	Gruppe 2	22	2	0,6	0	0	0				erbsengross	Eine Anzahl Kn. bis zu 1/2 mm.	0 Knötchen	
	Gruppe 3	10	1,6	0	0	0	0				doppelt hanf-samengross	0 Knötchen.	0 Knötchen	
	Gruppe 4	33	5,3	1	0	0	0				hanfsamen-gross	0 Knötchen.	0 Knötchen	
	Gruppe 5	100	11	1,3	0	0	0,2				hanfsamen-gross	0 Knötchen.	0 Knötchen	
	Gruppe 6	19	2,3	0,3	0	0	0				doppelt hanf-samengross	0 Knötchen.	0 Knötchen	
17.	Gruppe 1		∞	60	9,3	1	22	3,3	0,3		<nusskern-gross	ca. 50 Knötchen bis zu 1 mm.	0 Knötchen	
	Gruppe 2		3,3	1	0	0	0,5	0	0		doppelt hanf-samengross	ca. 50 Knötchen bis zu 2 mm.	0 Knötchen	
	Gruppe 3	6,2	21	3	0,3	0	0	0	0		hanfsamen-gross	0 Knötchen.	0 Knötchen	
	Gruppe 4	4,0	0,6	0	0	0	0	0	0		hanfsamen-gross	Eine Anzahl Kn. bis zu 1/2 mm.	0 Knötchen	
	Gruppe 5	5,5	12	2,3	0,3	0	0	0	0		hanfsamen-gross	0 Knötchen.	0 Knötchen	
	Gruppe 6	5,0	31	4,7	0,6	0	0	0	0		hanfsamen-gross	0 Knötchen.	0 Knötchen	

Gruppe 1	ca. 100	9	2,3	∞	ca. 100	12,3	nusskern- gross	nusskerngross Eine Anzahl Kn. bis zu 2 mm.	Unzählige winzige Knötchen
Gruppe 2	5	1	0	0	0	0	<nusskern- gross	Eine Anzahl Kn. bis zu 1 mm.	0 Knötchen
21. Gruppe 3	2	0	0	0	0	0	hanfsamen- gross	0 Knötchen.	0 Knötchen
Gruppe 4	4,5	0,3	0	0	0	0	erbsengross	Einzelne Knötchen bis zu 1/2 mm.	0 Knötchen
Gruppe 5	∞	ca. 150	15	2,3	3,3	0	erbsengross	Eine Anzahl Kn. bis zu 1 mm.	0 Knötchen
Gruppe 6	∞	47	8	1	0	0	erbsengross	Einzelne gerade noch sichtbare Knötchen.	0 Knötchen
Gruppe 1	∞	81	8	0	∞	6,3	nusskerngross	Eine Anzahl Kn. bis zu 2 1/2 mm.	Einzelne submil. Knötchen
Gruppe 2	7	0,3	0	0	0	0	nusskerngross	Eine Anzahl Kn. bis zu 1 mm.	0 Knötchen
Gruppe 3	4,5	0	0	0	0	0	hanfsamen- gross	6 Knötchen bis zu 3/4 mm.	0 Knötchen
24. Gruppe 4	17	2,7	0,3	0	0	0	hanfsamen- gross	0 Knötchen.	0 Knötchen
Gruppe 5	150	16	3	0	1	0	hanfsamen- gross	6 Knötchen bis zu 1 mm.	0 Knötchen
Gruppe 6	200	24	3,3	0,3	2	0	hanfsamen- gross	0 Knötchen.	0 Knötchen
Gruppe 1	100	12	1,3	0	27	2,2	>nusskern- gross	Fast zusammenfließende Knöt- chen bis zu 3 mm.	Unzählige submil. Knötchen
Gruppe 1	∞	ca. 100	8,3	2	∞	8	<nusskern- gross	Eine Anzahl Kn. bis zu 2 1/2 mm.	Unzählige submil. Knötchen
36. Gruppe 2	3,5	0,3	0	0	1,3	0	>nuss- gross	Eine Anzahl Kn. bis zu 1 1/2 mm.	2 submil. Knötchen
Gruppe 2	3,5	0,3	0	0	0	0	<nuss- gross	Eine Anzahl Kn. bis zu 1 mm.	0 Knötchen
Gruppe 3	0	0	0	0	0	0	nusskerngross	Eine Anzahl Kn. bis zu 1/2 mm.	0 Knötchen
Gruppe 5	∞	52	6,6	0,5	7,3	0	>erbsengross	Fast zusammenfließende Knöt- chen bis zu 3 mm.	0 Knötchen
Gruppe 5	∞	ca. 200	24	2,5	ca. 100	1,3	nuss-gross	Zahlreiche Knötchen bis zu 3 mm.	0 Knötchen

steht aus 7 unbehandelten und nicht-vakzinierten Kontrolltieren. Gruppe 2 setzt sich aus 7 vakzinierten und unbehandelten Meerschweinchen zusammen. Gruppe 3 besteht aus 7 vakzinierten Tieren, die nach der Infektion in der üblichen Weise mit Präp. 10 behandelt worden sind. Gruppe 4 besteht aus 6 vakzinierten Tieren, welche 6 Tage vor der Infektion mit Präp. 10 behandelt worden sind. Diese Behandlung sollte den ganzen Versuch hindurch fortgesetzt werden, aber 8 Tage nach Behandlungsbeginn und 2 Tage nach der Infektion waren die Tiere in die erwähnte Periode mit Oedembildung gekommen, weshalb einige Tage Pause eingeschoben werden und in einigen Fällen die Behandlung ganz aufhören musste.

Wie man aus der Tabelle 14 ersieht, in der der Versuch wiedergegeben ist, hat diese Gruppe keine ganz so hohe Blutkonzentration wie die übrigen behandelten Tiere gehabt. Mit dieser Behandlungsweise sollte untersucht werden, ob man, wenn die Überempfindlichkeit gegenüber Tuberkulin vor der Infektion herabgesetzt wurde, in negativer Richtung einen Ausgleich dafür fand, was die Behandlung in positiver Richtung leisten konnte. Die 3. Gruppe Meerschweinchen dient als Kontrolltiere für Gruppe 4.

Gruppe 5 besteht aus 7 nicht-vakzinierten Meerschweinchen, die in der üblichen Weise behandelt wurden, während Gruppe 6 sich aus 7 nicht-vakzinierten Meerschweinchen zusammensetzte, welche mit Präp. 10 in der üblichen Weise und in den ersten Tagen zugleich auch mit intramuskulärer Einspritzung des löslichen Natriumsalzes von Sulfamethylthiazol (100 mg 2mal täglich) behandelt wurden, um so schnell wie möglich nach der Infektion eine möglichst hohe Konzentration zu erzielen.

Das Ergebnis ist aus Tabelle 14 zu entnehmen. Es geht aus derselben hervor, dass bezüglich der Anzahl der in Lunge und Milz vorhandenen Tuberkelbazillen kein nennenswerter Unterschied in Gruppe 2, 3 und 4 vorhanden gewesen ist, d. h. dass bei den vakzinierten Tieren sich keine nennenswerte Wirkung der Behandlung mit Präp. 10 gezeigt hat, während wir in demselben Versuche eine Wirkung von Präp. 10 bei den

nicht-vakzinierten Meerschweinchen gesehen haben, s. Gruppe 1, 5 und 6. Dagegen haben wir keinen Unterschied bei Gruppe 3 und 4 finden können; aber da es sich um so wenige Tiere handelt, müssen wir diesen Versuch mit einer grösseren Anzahl Meerschweinchen wiederholen, bevor wir uns mit Sicherheit über diese Frage aussprechen können.

In diesem Versuche hörten wir 16 Tage nach der Infektion mit der Behandlung auf, um zu sehen, ob wir dadurch — zu dem Zeitpunkte, an dem, wie wir in den übrigen Versuchen erfahren hatten, die Wirkung des Präp. 10 weniger ausgesprochen war oder aufhörte —, der Wirkung des Stoffes auf die Immunität entgehen konnten. Indessen zeigte sich, dass sich in den Tieren so grosse Depots von Präp. 10 vorfanden, dass die Blutkonzentration, selbst 5 Tage nach Behandlungsschluss, noch so hoch wie 4,8—4,9 mg % war. In anderen Versuchen haben wir gesehen, dass die Blutkonzentration sogar 3 Wochen nach Behandlungsschluss sich um 2.2—4.7 mg % herum hielt.

Bricht man die in dieser Arbeit angewandte Behandlungsform, bei welcher Depots des Stoffes gebildet werden, zu frühzeitig ab, so erreicht man daher das Gegenteil von dem, was man erstrebt, indem die Blutkonzentration so stark sinkt, dass die bakterienschädigende Wirkung ganz oder teilweise verschwindet, während die desensibilisierende Wirkung beibehalten wird.

### *Diskussion.*

Den rein biologischen Gesamteindruck dieser Untersuchungen können wir deshalb dahingehend zusammenfassen, dass es eine sichere und ausgesprochene Wirkung dieser Stoffe auf die experimentelle Meerschweincheninfektion gibt. Es handelt sich nicht um eine vollständige Sterilisierung des Organismus von T. B.; eine *Therapia magna sterilisans* ist also nicht erreicht worden.

Die erzielte Wirkung ist am besten bei den Stoffen ge-

wesen, welche eine direkte tuberkelbazillentötende oder -hemmende Wirkung in vitro hatten. Innerhalb dieser Gruppe von Stoffen wirkte Sulfamethylthiazol am kräftigsten; obschon dieser Stoff nicht so stark tuberkelbazillentötend oder -hemmend in vitro gewirkt hat wie die übrigen Stoffe, scheint das günstigere Resultat nicht allein durch die etwas höhere Konzentration erklärt werden zu können, welche sich mit der angewandten Behandlungsweise im Blute erzielen liess. Wie aus den Tabellen hervorging, konnte mit dem Sulfathiazol eine Konzentration von 3—4 mg % erreicht werden, während mit dem Sulfamethylthiazol 5—8 mg % erzielt wurden. Da das Sulfathiazol indessen doppelt so stark in vitro wirkte als das Sulfamethylthiazol, müsste seine Wirkung auf jeden Fall ebenso gut sein wie die des Sulfamethylthiazols, falls es sich um ein rein quantitatives Verhältnis handelte. Das gleiche gilt für das Präparat 18. Weiterhin haben wir gesehen, dass die bakterienhemmende oder -tötende Wirkung in den ersten 14—18 Tagen der Infektion am stärksten ausgeprägt ist.

Man kann sich deshalb fragen, was nun die Ursache ist, dass dieser verheissungsvolle Anfang nicht ein weit besseres Schlussergebnis bewirkt. Die natürlichste Erklärung könnte die sein, dass die Stämme chemoresistent wurden. Indessen haben wir einige Versuche ausgeführt, in denen wir die Chemoresistenz von Stämmen geprüft haben, die von lange Zeit hindurch mit Sulfathiazol behandelten Tieren herrührten. Keiner dieser Stämme war mehr chemoresistent, als sie ursprünglich gewesen waren.

Die Erklärung ist möglich, dass in einem oder dem anderen Zeitpunkte der Behandlung sich ein Komplex dieser Chemotherapeutika und der Proteinstoffe des Organismus — evtl. Tuberkelbazillen — in der Weise bildet, dass er im Besitze einer antigenen Eigenschaft bleibt. Dass so etwas wahrscheinlich sein kann, scheint daraus hervorzugehen, dass nach 8—14 tägiger Behandlung der tuberkulösen Tiere eine sehr kräftige, über den ganzen Bauch sich ausdehnende Hautreaktion mit Oedem und Hyperämie, ja sogar Hämorrhagien, auftritt. Diese Reaktion erscheint nur bei den mit Tuberkelbazillen

infizierten Tieren, und es ist interessant zu beobachten, dass sie oft besonders stark an der Stelle ausgeprägt ist, wo die Infektion vor sich gegangen ist, oder wo zu einem früheren Zeitpunkte Tuberkulin in das Tier eingespritzt wurde.

Die Wirkung besteht augenscheinlich nicht allein in einer Hemmung oder Tötung der Tuberkelbazillen, sondern auch in einer Beeinflussung der Abwehrreaktion des Organismus. Nach allem zu urteilen, scheint diese Wirkung in negativer Richtung zu gehen, und wie man aus Fig. 1 und Tabelle I ersieht, sind es keine geringen Kräfte, die durch die Aufhebung der Überempfindlichkeit eliminiert werden. Für uns ist kein Zweifel daran möglich, dass wir durch diese Untersuchungen einen Fingerzeig in der rechten Richtung bekommen haben. Nun kommt es darauf an, mit Hilfe von Substitution verschiedener Gruppen in den erwähnten Stoffen eine Erhöhung der parasitotropen und eventuell gleichzeitig eine Verminderung der organotropen Wirkung zu versuchen, da die letztere augenscheinlich eine volle Ausnutzung des Effektes dieser Stoffe bei der tuberkulösen Infektion verhindert.

Die Frage ist nun erlaubt, ob diese Resultate dazu berechtigen, die genannten Präparate zur Behandlung von Tuberkulosepatienten anzuwenden.

Es ist eigentlich nicht Sache des Biologen, diese Frage zu beantworten; übrigens sind zahlreiche Patienten mit Sulfonamiden behandelt worden, lange ehe ausreichende Tierversuche vorlagen. Es existieren auch einige Aufstellungen über die Wirkung, welche zwar nicht umfassend sind, aber eigentlich eine recht deutliche Sprache sprechen.

Die angewandten Präparate sind indessen hauptsächlich Sulfanilamid u. Sulfapyridin gewesen, von denen jedenfalls das Sulfapyridin in unseren Versuchen keine nennenswerte Wirkung weder in vitro noch in vivo gehabt hatte.

So führt *Vannfält*<sup>10)</sup> an, dass er bei Nachuntersuchungen von 16 Patienten mit ernster Lungentuberkulose, die mit Sulfapyridin und anderen Sulfonamiden behandelt worden waren, gefunden hat, dass diese Fälle einen mehr malignen und mehr langwierigen Verlauf der Tuberkulose aufwiesen. Das gilt be-



sonders von den mit Sulfapyridin behandelten Patienten. Es waren 10 behandelt worden, von denen 3 starben, während von den 7 anderen 6 einen mehr oder weniger starken Grad von Progression, auf jeden Fall keine Besserung, aufwiesen. Der Autor meint, dass man noch grössere Erfahrungen sammeln müsse, warnt aber bereits jetzt vor einem unkritischen Gebrauch von Sulfonamiden bei Patienten mit Lungentuberkulose.

*Allison & Myers*<sup>20)</sup> haben 7 überwiegend exsudative Fälle ohne Kavernen mit Sulfapyridin behandelt und äussern sich dahin, dass es auf jeden Fall keine günstige, eher eine schädliche Wirkung gegeben hat.

Andere Autoren, darunter *Oscarsson*<sup>21)</sup>, *Nilsson*<sup>22)</sup>, *Crawford*<sup>23)</sup> und noch mehrere, haben über das Ergebnis der Behandlung mit Sulfonamiden bei Patienten berichtet, die ausser Tuberkulose noch Pneumonien oder andere Komplikationen hatten. Sie sind sich alle darüber einig, dass diese Komplikationen niedergekämpft wurden, ohne dass eine Verschlimmerung des tuberkulösen Prozesses eingetreten war. Da sie alle darin übereinstimmen, dass diese Komplikationen gewöhnlich die Tuberkulose verschlimmern, meinen sie, dass die Präparate zur Behandlung der Komplikationen, z. B. von Pneumonie, angezeigt sind.

Betrachtet man die Frage von einem rein biologischen Standpunkte, so muss man sich vor Augen halten, was man im Tierversuch gesehen hat, nämlich dass die Tuberkulinüberempfindlichkeit und damit die Immunität nach Behandlung mit den genannten Präparaten herabgesetzt wird. Falls das auch beim Menschen der Fall ist, könnte es darauf hindeuten, dass man zur Behandlung komplizierter Lungentuberkulosen eine intensive, kurzdauernde Behandlung unter genauer Überwachung der Tuberkulinempfindlichkeit anwenden sollte, und zwar mit denjenigen Präparaten, die sich in diesen Untersuchungen als die wirksamsten erwiesen haben.

Betreffs der unkomplizierten Lungentuberkulosen, bei denen man sich eine Behandlung der Tuberkulose als solcher denken könnte, meinen wir, dass man auf dem experimentel-

len Wege weiterschreiten muss, ehe man zuschlägt. Nur in Fällen, in welchen man sich darüber klar ist, dass man das Recht hat, dem Patienten eine letzte Chance zu geben, z. B. bei einer tuberkulösen Meningitis, glauben wir, dass man von diesem Standpunkte abweichen darf. In einem solchen Falle muss man mit den genannten wirksamen Präparaten in sehr grossen und häufig wiederholten Dosen behandeln, sodass eine so hohe und konstante Blutkonzentration wie möglich erreicht wird.

#### LITERATURVERZEICHNIS.

- 1) *Jensen, K. A.*: Acta path. et microbiol. scand. Suppl. XI, S. 63, Lund 1932.
- 2) — VIII Conf. de l'Union intern. contre la tuberculose. Haag 1932, S. 22.
- 3) *Jensen, K. A., Bindsløv, G. und Holm, Johs.*: Acta Tub. Scand. 1935, 9, 27.
- 4) *Jensen, K. A. und Bindsløv, G.*: Acta Tub. Scand. 1937, 11, 101.
- 5) *Jensen, K. A.*: Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 1932, 125, 222 und Nord. Med. Tidsskrift. 1934, 7, 590.
- 5a) *Jensen, K. A., Lester, V. und Tolderlund, K.*: Acta Tub. Scand. 1940, 14, 125.
- 6) *Heimbeck, J.*: Archives of Intern. Med. Juni 1932, 49, 957.
- 7) *Rich, A. R. und Follis, R. H.*: Bull. of The Johns Hopkins Hosp. 1938, 62, 77.
- 8) *Follis, R. H.*: Amer. Rev. of Tuberculosis. 1940, 41, 117.
- 9) *Birkhaug, K.*: Brit. med. Journal. Juli 1939, 54.
- 10) — Acta Tub. Scand. 1940, 14, 180.
- 11) *Buttle, J. A. H. und Parish, H. J.*: Brit. med. Journal. Oktober 1938, 776.
- 12) *Grey, P. H., Cambel, H. H. und Cully, A. W.*: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1938—39, 22.
- 13) *Kolmer, J. A., Raiziss, G. W. und Rule, A. M.*: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1938—39, 581.
- 14) *Smithburn, K. C.*: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1938, 38, 574.
- 15) *Flippin, F., Forrester, J. S. und Fitz-Hugh, T.*: Rev. of Tuberculosis 1940, 42, 821.
- 16) *Heise, F. H. und Steenken, W. J.*: Am. Rev. Tuberc. 1940, 42, 801.

- 17) *Climenko, D. R. C.*: Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 1940, 43, 624.
- 18) *Steinbach, M. M.* und *Duca, C. J.*: Proc. Soc. exp. Biol. & Med. 1940, 44, 133.
- 18a) *Schmith, K.* und *Reymann, F.*: Nordisk Medicin 1940, 8, 2500.
- 18b) *Bindslev, G.*: Overfølsomhed og Immunitet ved Tuberkulose. Disputats. Kobenhavn 1939.
- 19) *Vannfält, K. A.*: Nord. Med. Tidskrift. 1941, 9, 163.
- 20) *Allison, S. T.* und *Myers, R.*: Journ. Am. Med. Ass. 1939, 113, 1631.
- 21) *Oscarsson, P. N.*: Svenska Läkartidningen 1942, Nr. 2.
- 22) *Nilsson, F.*: Nord. Med. Tidskrift. 1944, 12, 2899.
- 23) *Crawford, J. H.*: Brit. med. Journal. 1939, 1, 608.

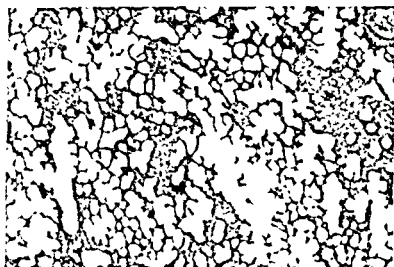
Fig. 2.

Nicht-immunisierte  
Meerschweinchen.

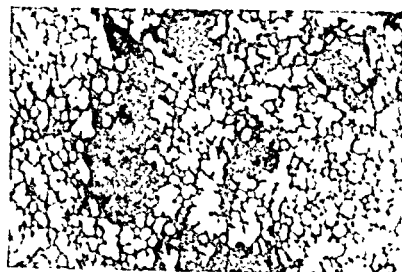
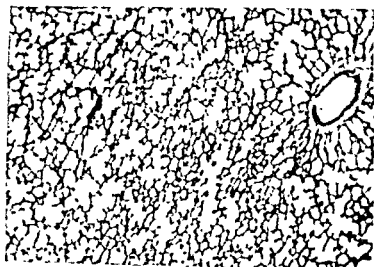
Immunisierte  
Meerschweinchen.

3 Tage.

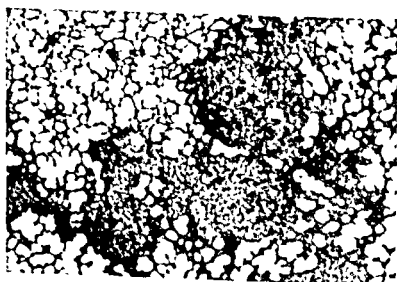
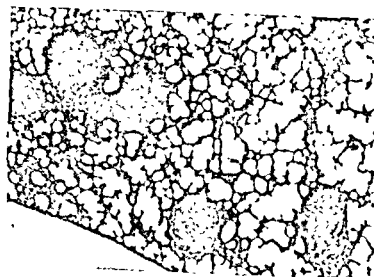
Normales Lungenbild.



9 Tage.

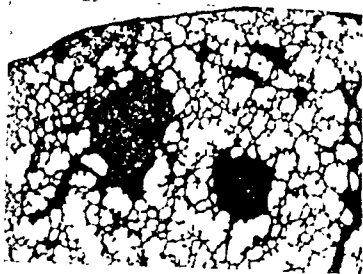
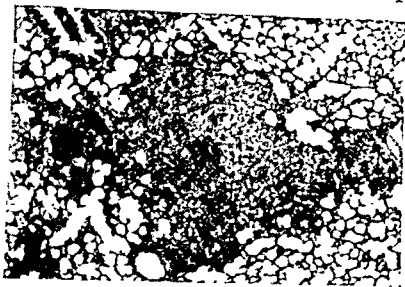


11 Tage.

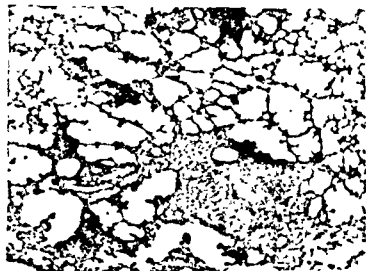
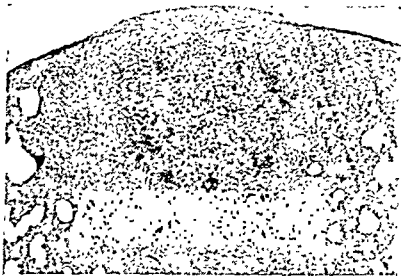


*Fig. 2.*

13 Tage.



24 Tage.



Schwache Vergrößerung  
24 Tage.



Fig. 7.

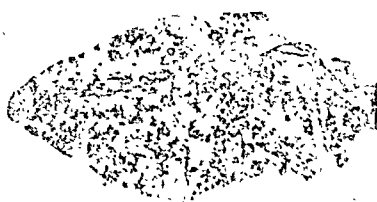
Kontrollmeerschweinchen.

Meerschweinchen  
behandelt mit Präparat 10.

16 Tage.



19 Tage.



27 Tage.

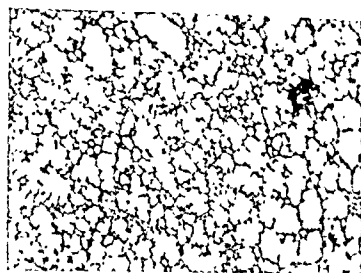


Fig. 8.

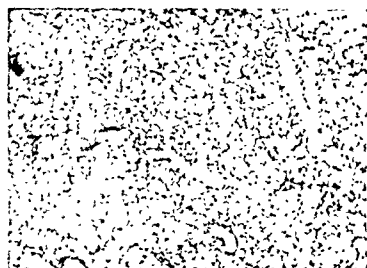
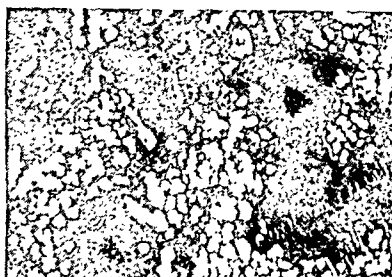
Kontrollmeerschweinchen.

Meerschweinchen  
behandelt mit Präparat 10.

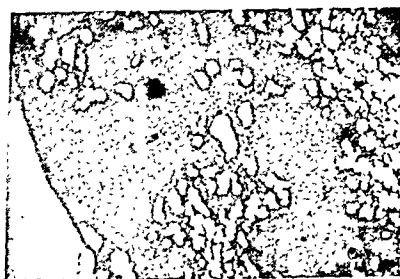
14 Tage.



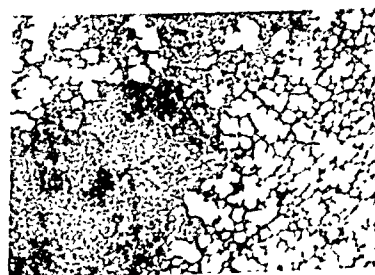
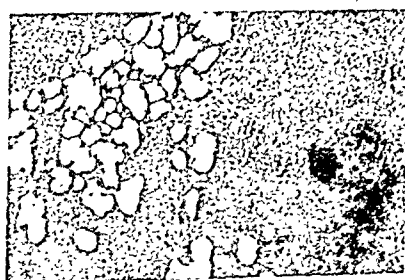
16 Tage.



19 Tage.



24 Tage.



## ABSTRACTS — ANALYSES — REFERATE.

*Ivar Broman: Människokroppens Topografiska Anatomi. Med praktiska Tillämpningar af Dozent Erik Ask-Upmark. (547 Seiten, 365 teilweise mehrfarbige Abbildungen. Preis: geb. 58,50 dän. Kronen). Ahlén og Sönners Förlag, Stockholm 1941.*

Als Abrundung und Abschluss des grossen anatomischen Lehrbuchs »Människokroppen« I—III, das in den Jahren 1934—1936 erschien, hat I. Broman jetzt das Werk »Människokroppens Topografiska Anatomi« herausgegeben.

Jeder einzelne Abschnitt ist gründlich behandelt, der Stoff ist vortrefflich geordnet, die Darstellungsform ist kurz und klar und der Umfang entspricht fast den Examensforderungen an topografischer Anatomie, die von der Kopenhagener Universität gefordert werden. Broman hat infolge seiner grossen Erfahrung den Stoff von vielen, weniger wichtigen Einzelheiten »gesäubert«, und in Zusammenarbeit mit Ask-Upmark ist es gelungen, den Abschnitten über angewandte Anatomie eine vollständig zeitentsprechende Form zu geben. Das Buch kann mit grossem Nutzen von Studenten und praktischen Ärzten gelesen werden, was wohl auch die Meinung der Verfasser bei der Zurechtlegung war.

Das Bildmaterial ist — abgesehen von einigen Bildern — ausgezeichnet, es besteht teils aus neuen originalen Bildern, teils ist es mit Sorgfalt aus einer Reihe ausländischer Werke ausgewählt.

Das Buch ist ein wertvoller Zuwachs in der Reihe der skandinavischen Lehrbücher und kann empfohlen werden.

C. J. M.

---

*R. Wagner: Methodik und Ergebnisse fortlaufender Blutdruckschreibung am Menschen. 153 Seiten, 64 Abbildungen. Preis RM. 9,— (geb. RM. 10,12). Georg Thieme, Leipzig 1942.*

Nach der Beschreibung der Apparatur werden die statischen und dynamischen Eigentümlichkeiten der Versuchsanordnung be-



sprochen. Der Verfasser misst bei Menschen kontinuierlich den systolischen und diastolischen Blutdruck (BT) und untersucht seine Schwankungen und sein Verhalten unter verschiedenen Einwirkungen.

Die Traube-Hering-Mayer'schen Schwankungen (THM) werden zuerst einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Dabei stellt sich heraus, dass Faktoren wie die  $\text{CO}_2$ -Spannung, psychische Einwirkung und reflektorische Einwirkung auf die vasomotorischen Zentren für die Höhe und Dauer der THM-Schwankungen von Bedeutung sind. Das Verhalten derselben zur Herzaktion, Pulsdruckamplitude, zum systolischen und diastolischen BT und zur Respiration wird erörtert.

Nach Amylnitriteinwirkung erscheint zunächst eine leichte Blutdruckerhöhung, die psychischer Natur ist. Danach kommt eine Herabsetzung, die beim systolischen BT grösser ist als beim diastolischen. Dieser Unterschied verschwindet bei wiederholter Einwirkung, gleichzeitig aber wird der Abstieg kleiner. Schliesslich wird oft eine leichtere Blutdruckerhöhung angetroffen, die sich nicht beheben lässt, weshalb vor der Anwendung von Amylnitrit bei Hypertonie gewarnt wird. Die Pulskurve zeigt oft überdikroten Puls. BT und Puls sind unabhängig voneinander. Die Respiration wird zuerst langsamer, grösser und regelmässiger, danach schneller und unregelmässig.

Kap. IV, V und VI enthalten eine sorgfältige Beschreibung der BT-Kurven bei Aschners Bulbusdruck bzw. Valsalvas Versuch und Bulbusdruckversuch.

Zum Schluss wird das Verhältnis des Kreislaufs und der Respiration zum Brechreiz besprochen.

*P. Sobyé.*

## ÜBER DIE COLIFLORA DES GESUNDEN MENSCHEN.\*)

Von F. Kaufmann und Beate Perch.

(Eingegangen bei der Redaktion am 18. April 1942).

Das Problem, ob der gesunde Mensch in seinen Faeces stets denselben Coli-Typ aufweise, oder ob ein häufiger Wechsel der Coliflora vorkomme, galt bisher als ungelöst. Dieses zeigt eine kürzlich erschienene Arbeit von A. Boivin, L. Corre und Y. Lehault, in der diese Frage diskutiert, aber nicht beantwortet wird.

Bereits im Anfang serologischer Untersuchungen, in den Jahren 1900—1903, haben einige Autoren, wie M. Jatta, A. Radziewsky sowie K. Totsuka, gefunden, dass die im Darm gesunder Menschen vorkommenden Coli-Bakterien serologisch nicht einheitlich waren; doch sind diese Untersuchungen bei dem damaligen Stande der Serologie nicht völlig beweisend. In neuerer Zeit hat sich — soweit uns bekannt — nur O. Mikkelsen mit dieser Frage befasst, und zwar in seiner 1927 erschienenen Monographie: »Undersøgelser over de hos Mennesket forekommende Former af Bacterium coli«. Bei der Untersuchung zahlreicher Einzelkolonien aus Faecesproben mehrerer Personen fand er in derselben Probe gleichzeitig mehrere Coli-Typen, die sich in kultureller und serologischer Hinsicht von einander unterschieden. Auch bei der Untersuchung verschiedener Darmabschnitte bei menschlichen Leichen konnte er nicht nur in verschiedenen Darmabschnitten, sondern auch in demselben Abschnitte verschiedene Coli-Typen nachweisen.

---

\*) Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden am 10. 4. 42 in der Dänischen Pathologen-Vereinigung Kopenhagen vorgetragen.

Trotzdem man also auf Grund der Literaturangaben damit rechnen musste, dass verschiedene Coli-Typen in den Faeces eines gesunden Menschen vorkämen, so hörte man häufig die Ansicht, dass jeder Mensch seinen eigenen Individual-Coli-Stamm besäße, der an ihn angepasst sei und in dauernder Symbiose mit ihm lebe. Um uns über diese Frage ein Urteil bilden zu können, haben wir ein halbes Jahr lang unsere eigenen Faeces in gewissen Abständen bakteriologisch untersucht, wobei wir uns nur auf die Coliflora beschränkten. Unsere Ernährung war zur Zeit der Versuche (September 1941—Februar 1942) die übliche und wurde absichtlich in keiner Weise geändert. Unser Gesundheitszustand war in dieser Zeit im allgemeinen normal, wenn wir von 2 vorübergehenden Darmstörungen, auf die wir noch weiter unten zu sprechen kommen, absehen.

### *Technik der Untersuchungen.*

#### *1. Kulturelle Untersuchungen.*

Die Faecesproben wurden sofort nach Entnahme auf Drigalski-agar-Platten (modifiziert) ausgestrichen, sodass zahlreiche Einzelkolonien entstanden. Sahen die einzelnen Kolonien alle gleich aus, so wurden wahllos 2—6 Kolonien auf Agarplatten abgeimpft. Sahen einige Kolonien verschieden aus, so wurden auch diese abweichenden Kolonien berücksichtigt. Von diesen Abimpfungen wurden erneut — nach Aufschwemmung in Bouillon — Agarplatten angelegt, sodass zahlreiche einzelne Kolonien entstanden. Von einigen dieser Einzelkolonien wurden dann neue Agarplatten angelegt, von denen die kulturellen und serologischen Untersuchungen ausgingen. Diese wiederholten Ueberimpfungen mit zweimaligem Ausgange von Einzelkolonien erfolgten, um Coli-Mischkulturen auszuschalten und um die Kulturen an die Züchtung auf künstlichen Substraten zu gewöhnen.

Die kulturelle Untersuchung umfasste folgende Medien: Vergärungsröhrchen mit Liebigs Fleischextract-Bouillon als Grundlage und folgenden Substanzen: Adonit, Dulcit, Sorbit, Arabinose, Xylose, Rhamnose, Maltose, Salicin, Inosit, Lactose, Saccharose, Mannit, Dextrose und Xylose. Die Röhrchen mit Mannit und Dextrose enthielten Gärungsröhrchen zur Bestimmung der Gasbildung. Ferner wurde zum Indol-Nachweis ein Röhrchen mit trypsinverdauter Caseinbouillon beimpft sowie ein Röhrchen mit Ferrochloridgelatine für  $H_2S$ -Bildung und Gelatineverflüssigung. Ausserdem wurden 2

Ammonnährböden mit Dextrose und Na-Citrat sowie eine Brillantgrünagarplatte beimpft (Betr. Nährboden-Recepte siehe bei *F. Kauffmann*: Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe).

Die Ablesung der Vergärungsröhrchen erfolgte täglich im Laufe von 30 Tagen. Die Ammonnährböden wurden nur 4 Tage lang beobachtet, die Gelatineröhrchen dagegen 6 Wochen lang. Die Ablesung der  $H_2S$ -Bildung erfolgte nach 2 Tagen, die Feststellung der Indol-Bildung nach 1 Tage. Alle untersuchten Kulturen waren gram-negative Stäbchen.

## 2. Serologische Untersuchungen.

Von allen Coli-Kulturen, die sich kulturell von einander unterschieden, sowie von mehreren Kulturen, die sich kulturell einheitlich verhielten, wurden Kaninchen-Immunseren hergestellt, und zwar O-Immunseren. Ausserdem wurden von einer Reihe der Kulturen Immunseren mit lebenden Bakterien und Formalin-Bouillonkulturen hergestellt.

Zur O-Serumherstellung wurden 20 std. Bouillonkulturen benutzt, die  $2\frac{1}{2}$  Std. lang auf  $100^\circ$  C. im Dampftopfe erhitzt waren. Zur Immunisierung mit lebenden Bakterien wurden 20 std. Agarkulturen angewandt, zur Immunisierung mit Formalin-Bakterien 20 std. Bouillonkulturen, die mit 0,5 % Formalin versetzt waren und dann 20 Std. bei  $37^\circ$  C. gestanden hatten. Die fertigen Immunseren wurden mit 0,1 ‰ Merthiolat konserviert und im Eisschrank ( $+4^\circ$  C.) aufgehoben. Für jedes Serum wurden mindestens 2 Kaninchen benutzt, deren Seren gemischt wurden. Im ganzen wurden 70 verschiedene Immunseren hergestellt, die in folgender Liste verzeichnet sind.

### Liste der Kaninchen-Immunseren.

- I. K-Immunseren (mit Coli-Stämmen der Versuchsperson K. hergestellt).

14 O-Immunseren: K 1a, K 1c, K 5b, K 6b, K 8b, K 9a, K 11a, K 11c, K 12a, K 12c, K 13a, K 14a, K 14b, K 14e.

8 Immunseren mit lebenden Bakterien hergestellt: K 1a, K 5b, K 6b, K 8b, K 9a, K 12a, K 13a, K 14e.

1 Immunserum mit Formalin-Bouillonkultur hergestellt: K 1a.  
Es wurden also 23 K-Immunseren hergestellt.

II. *P*-Immunseren (mit Coli-Stämmen der Versuchsperson *P*. hergestellt).

26 O-Immunseren: *P* 1a, *P* 1c, *P* 2a, *P* 3a, *P* 6a, *P* 6b, *P* 6c, *P* 7a, *P* 7b, *P* 7d, *P* 8a, *P* 8b, *P* 9a, *P* 9b, *P* 9c, *P* 10a, *P* 10b, *P* 11a, *P* 11b, *P* 11c, *P* 12a, *P* 12b, *P* 13a, *P* 13b, *P* 14a, *P* 14c.

14 Immunseren mit lebenden Bakterien hergestellt: *P* 1a, *P* 1c, *P* 2a, *P* 3a, *P* 6a, *P* 6b, *P* 6c, *P* 7a, *P* 7b, *P* 7d, *P* 12a, *P* 13a, *P* 13b, *P* 14c.

7 Immunseren mit Formalin-Bouillonkulturen hergestellt: *P* 1a, *P* 1c, *P* 2a, *P* 3a, *P* 6a, *P* 6b, *P* 6c.

Es wurden also 47 *P*-Immunseren hergestellt, sodass wir im ganzen 70 Immunseren zur Verfügung hatten.

Zur Agglutination wurden teils lebende Agarkulturen (Aufschwemmung in NaCl-Lösung), teils 100°-Bouillonkulturen und teils Formalin-Bouillonkulturen angewandt. Die Agglutination mit lebenden Bakterien wurde nach 2 Std. 37° C. und 20 Std. Zimmertemperatur, diejenige mit 100°-Bakterien nach 20 Std. Wasserbad 50° C. und diejenige mit Formalin-Bouillonkulturen nach 4 Std. Wasserbad 50° C. abgelesen. Zur Absorption wurden teils lebende Agarkulturen, teils 100°-Bakterien (1 Std. 100°) angewandt. Die Absorption erfolgte 2 Std. bei 37° C. und 20 Std. im Eisschranke.

Zur Bestimmung der O-Antigene wurden stets gekochte Bouillonkulturen benutzt, die in der Reagenzglas-Agglutination angesetzt und nach 20 Std. Wasserbad 50° C. abgelesen wurden.

### *Ergebnisse der Untersuchungen.*

Um die Versuchsergebnisse übersichtlich darzustellen, sollen die Coli-Stämme, die aus beiden Versuchspersonen (*K*. und *P*.) isoliert wurden, getrennt aufgeführt werden.

#### *1. Die K-Stämme.*

Die einzelnen Faecesproben wurden mit *K* 1, *K* 2 u. s. w. bezeichnet. Wurden nun z. B. von der Faecesprobe *K* 1 drei verschiedene Kolonien untersucht, so wurden sie mit *K* 1 a, *K* 1 b und *K* 1 c bezeichnet. Stellte sich bei der weiteren Untersuchung heraus, dass die beiden Kulturen *K* 1 a und *K* 1 b identisch waren, so erhielten beide die Typenbezeichnung *K* 1 a. Die dritte Kultur, die nicht zum *K* 1 a-Typ gehörte, erhielt die

Typenbezeichnung K 1 c. In der entsprechenden Weise erhielten die 4 Kulturen der K 2-Probe (K 2 a, K 2 b, K 2 c, K 2 d) die Typenbezeichnung K 1 a, nachdem sich die Identität dieser Kulturen mit der K 1 a-Kultur herausgestellt hatte. In der Tabelle 1 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengestellt.

*Tabelle 1.*  
*Verzeichnis der K-Kulturen.*

Faecesprobe	Datum der Entnahme	Zahl der untersuchten Kolonien	Zahl der gefundenen Serotypen
K 1	15. 9. 41	3	K 1a (2×), K 1c (1×)
K 2	20. 9. 41	4	K 1a (4×)
K 3	21. 9. 41	2	K 1a (2×)
K 4	28. 9. 41	2	K 1a (2×)
K 5	3. 10. 41	2	K 1a (2×)
K 6	8. 10. 41	2	K 1a (1×), K 6b (1×)
K 7	11. 10. 41	2	K 1a (2×)
K 8	13. 10. 41	2	K 1a (1×), K 8b (1×)
K 9	19. 10. 41	4	K 1a (2×), K 9a (2×)
K 10	26. 10. 41	2	K 1a (2×)
K 11	1. 11. 41	4	K 11a (4×)
K 12	3. 12. 41	4	K 12a (4×)
K 13	3. 1. 42	4	K 12a (4×)
K 14	1. 2. 42	6	K 12a (2×), K 14a (1×), K 14b (1×), K 14c (2×)
14 Proben	15. 9. 41—1. 2. 42	43 Kulturen	10 Typen

Aus der Tabelle 1 geht hervor, dass 43 Coli-Kulturen aus 14 Faecesproben der Versuchsperson K. zu 10 verschiedenen serologischen Typen gehörten. In der Zeit vom 15.9.—26.10.41 war der K 1 a-Typ vorherrschend, verschwand dann jedoch völlig und wurde von mehreren anderen Typen abgelöst. Von 43 Kulturen gehörten 20 zum K 1 a-Typ.

Die Faecesausstriche K 1 bis K 11 einschliesslich ergaben auf den Drigalskiplatten fast Reinkulturen von Coli (rote Kolonien). In der Probe K 12 traten einige blaue Kolonien auf, die sich bei näherer Untersuchung als Coli-Stämme mit verzögerter Lactosespaltung erwiesen, jedoch nicht serologisch untersucht wurden. Dasselbe war bei der K 13-Probe der Fall, in der überwiegend normale Coli-Kolonien, daneben einige spät lactosevergärende Kolonien vorkamen. Die K 14-Probe enthielt fast nur blaue Kolonien und ganz vereinzelt rote Kolonien. Es bestand seit 8 Tagen (ab 24. 1. 42) eine Obstipation, die etwa 2 Wochen lang anhielt. Im Laufe der folgenden Wochen verschwanden die blauen Coli-Kolonien allmählich, sodass wieder eine normale Coliflora bestand.

### *Die O-Antigene der K-Stämme.*

Zur Differenzierung der hier untersuchten Stämme wurde die O-Agglutination benutzt. Sämtliche Kulturen wurden als gekochte Bouillonkulturen mit sämtlichen zur Verfügung stehenden O-Seren in der Reagenzglas-Agglutination geprüft. Die zu dem gleichen Typ gehörenden Kulturen agglutinierten in dem entsprechenden O-Serum bis zum Titer und waren imstande, dieses Serum zu absorbieren. Ausserdem gehörten alle diese Kulturen zu demselben Vergärungstyp. In denjenigen Fällen dagegen, in denen kulturelle Unterschiede bestanden, gehörten die Kulturen zu anderen Serotypen, sodass man auf Grund der kulturellen Untersuchung eine vorläufige Gruppierung vornehmen konnte. Über die Ergebnisse der O-Agglutination gibt die Tabelle 2 Auskunft, in der nur die 10 serologisch verschiedenen K-Typen dargestellt sind.

Die Tabelle 2 zeigt, dass die 10 K-Typen auf Grund der O-Agglutination in 2 Gruppen eingeteilt werden können, da 7 Typen hohe O-Agglutinationstiter von mindestens 1 : 5120 ergaben, während 3 Typen (K 1 c, K 9 a und K 14 a) niedrige O-Titer von 1 : 160 aufwiesen. Da ausserdem diese 3 Typen auf einander übergreifende O-Agglutinationen (bis 1 : 80) zeigten, kann hier kein Zufall vorliegen, zumal zur Immunsorum-Herstellung je 2 Kaninchen pro Stamm benutzt wurden. Um festzustellen, dass die 3 erwähnten Typen K 1 c,

K 9 a und K 14 a tatsächlich serologisch verschieden waren, wurden Absorptionsversuche ausgeführt, die in der Tabelle 3 zusammengefasst sind.

*Tabelle 2.*  
*Ergebnisse der O-Agglutination.*

100°— Kultur	O-Immunseren der K-Stämme									
	1a	1c	6b	8b	9a	11a	12a	14a	14b	14c
K 1a	5120	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K 1c	0	160	0	0	80	0	0	80	0	0
K 6b	0	0	5120	0	0	0	0	0	0	0
K 8b	0	0	0	5120	0	0	0	0	0	0
K 9a	0	80	0	0	160	0	0	80	0	0
K 11a	0	0	0	0	0	5120	0	0	0	0
K 12a	0	0	0	0	0	0	5120	0	0	160
K 14a	0	80	0	0	80	0	0	160	0	0
K 14b	0	0	0	0	0	0	0	0	5120	0
K 14c	0	0	0	80	20	0	640	0	0	5120

Zeichenerklärung: Die Zahlen geben die Agglutinationstiter an; doch wurden die Agglutinationsreihen bei 1:5120 abgebrochen, sodass bei einigen Seren die Endtiter nicht erreicht wurden. 0 = < 20. Zur Agglutination wurden 20 std. Bouillonkulturen, die 1 Std. lang auf 100° C. erhitzt waren, benutzt. Die Ablesung erfolgte nach 20 std. Aufenthalte im Wasserbade von 50° C.

Aus der Tabelle 3 geht die Verschiedenheit der 3 untersuchten Typen K 1 c, K 9 a und K 14 a hervor. Will man die

*Tabelle 3.*  
*Ergebnisse der O-Absorption.*

Agglutiniert mit 100° — Kultur	O-Immunseren					
	K 1c absorbiert mit		K 9a absorbiert mit		K 14a absorbiert mit	
	K 9a	K 14a	K 1c	K 14a	K 1c	K 9a
K 1c	40	80	0	0	0	0
K 9a	0	0	40	80	0	0
K 14a	0	0	0	0	160	160



Unterschiede formelmässig ausdrücken, so kann man folgende Formeln aufstellen:  $K\ 1\ c = 1,2$ ;  $K\ 9\ a = 1,3$  und  $K\ 14\ a = 1,4$ .

Die übrigen 7 K-Typen sind — wie die Tabelle 2 zeigt — sehr deutlich von einander unterschieden. Ein stärkeres Übergreifen findet nur zwischen  $K\ 12\ a$  und  $K\ 14\ e$  statt; doch zeigte der Absorptionsversuch, dass es sich hierbei um ein gemeinsames Partialantigen handelt, sodass also beide Typen von einander verschieden sind.

Zur Kontrolle wurden ferner mehrere Absorptionsversuche, teils mit identischen, teils mit verschiedenen Kulturen, ausgeführt, die alle das erwartete Ergebnis hatten. Kulturen die zum gleichen Typ gehörten, erschöpften das entsprechende Serum restlos, während andere Kulturen, die zu einem fremden Typ gehörten, das Serum unbeeinflusst liessen. Irgendwelche Störungen der Agglutination resp. Absorption traten bei der hier angewandten Technik nicht auf, sodass man in allen Fällen zu klaren Entscheidungen gelangte.

### *Das kulturelle Verhalten der K-Stämme.*

Die 43 untersuchten K-Stämme verhielten sich in folgender Hinsicht einheitlich: Alle wuchsen üppig auf Agar und trübten die Bouillon diffus. Keiner der Stämme wuchs auf Brillantgrünagar. Alle waren ammonstark, d. h. sie wuchsen auf Ammonagar mit Dextrose. Keiner der Stämme wuchs dagegen auf Ammonagar mit Na-Citrat.

Alle Kulturen spalteten Sorbit, 42 Kulturen am 1. Tage, eine Kultur ( $K\ 14\ b$ ) am 2.—3. Tage. Arabinose, Dextrose, Maltose, Mannit, Trehalose und Xylose wurden von allen Kulturen prompt gespalten. Alle Kulturen bildeten Gas aus Dextrose und Mannit. Keiner der Stämme bildete  $H_2S$ . Gelatine wurde von 42 Stämmen nicht verflüssigt, 1 Stamm ( $K\ 6\ b$ ) verflüssigte spät und langsam die Gelatine.

Lactose wurde von allen Kulturen prompt gespalten; doch kamen innerhalb des  $K\ 14\ e$ -Typ Stämme vor, die Lactose verzögert nach einigen Tagen spalteten und auf Drigalskiagar

nach 24 Std. blau wuchsen. Keiner der Stämme spaltete Adonit und Inosit. Mit Ausnahme des Stammes K 1 c bildeten alle Kulturen Indol. Das allen K-Stämmen gemeinsame Verhalten geht aus der folgenden Zusammenstellung hervor:

Adonit,	Arabinose,	Xylose,	Maltose,	Inosit,	Mannit,	Dextrose,
— <sup>30</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	— <sup>30</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Trehalose,	H <sub>2</sub> S,	Ammon-Dextrose,	Ammon-Na-Citrat			
+ <sup>1</sup>	—	+	—			

Das Verhalten in Dulcitol, Rhamnose, Salicin und Saccharose war bei den einzelnen Stämmen verschieden und gestattete die Aufstellung mehrerer Vergärungstypen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 3.

Vergärungstypen der serologisch verschiedenen K-Typen.

Typ	Dulcitol	Sorbit	Rhamnose	Salicin	Saccharose	Indol
K 1a	+	+	+	+ <sup>2</sup>	— <sup>30</sup>	+
K 1c	+ <sup>2,3</sup>	+	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	— <sup>30</sup>	—
K 6b	+	+	— <sup>30</sup>	+ <sup>2</sup>	+ <sup>31</sup>	+
K 8b	— <sup>30</sup>	+	+	— <sup>30</sup>	— <sup>30</sup>	—
K 9a	— <sup>30</sup>	+	+	+ <sup>1,2</sup>	— <sup>30</sup>	—
K 11a	— <sup>30</sup>	+	+	+ <sup>1,2</sup>	— <sup>30</sup>	—
K 12a	+	+	+	—(+)	— <sup>30</sup>	+
K 14a	—(+)	+	+	— <sup>30</sup>	— <sup>30</sup>	—
K 14b	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2,3</sup>	+	+ <sup>2,4</sup>	— <sup>30</sup>	—
K 14c	+ <sup>2</sup>	+	+	+ <sup>2</sup>	+	—

Zeichenerklärung: + = positiv nach 1 Tage, +<sup>2</sup> = positiv nach 2 Tagen, —(+) = spät und unregelmässig positiv, zuweilen negativ, —<sup>30</sup> = negativ nach 30 Tagen.

Das Dulcitol wurde von 19 K 1a-Stämmen nach 1 Tage, von 1 Stamm nach 2 Tagen gespalten.

Aus der Tabelle 4 geht hervor, dass die 10 serologisch verschiedenen K-Typen zu 9 verschiedenen Vergärungstypen gehören, da die Typen K 9a und K 11a kulturell einheitlich sind.

## 2. Die P-Stämme.

In der entsprechenden Weise, in der die K-Stämme bezeichnet sind, wurden auch die P-Stämme, die aus der Versuchsperson P. isoliert waren, benannt. In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse dieser Faeces-Untersuchungen zusammengestellt.

Tabelle 5.  
Verzeichnis der P-Kulturen.

Faeces-probe	Datum der Entnahme	Zahl der untersuchten Kolonien	Zahl der gefundenen Serotypen
P 1	15. 9. 41	4	P 1a(2×), P 1c(2×)
P 2	21. 9. 41	4	P 2a(4×)
P 3	23. 9. 41	2	P 3a(2×)
P 4	28. 9. 41	0	—
P 5	30. 9. 41	0	—
P 6	1. 10. 41	4	P 6a(2×), P 6b(1×), P 6c(1×)
P 7	8. 10. 41	4	P 7a(2×), P 7b(1×), P 7d(1×)
P 8	13. 10. 41	2	P 8a(1×), P 8b(1×)
P 9	20. 10. 41	3	P 9a(1×), P 9b(1×), P 9c(1×)
P 10	27. 10. 41	2	P 10a(1×), P 10b(1×)
P 11	3. 11. 41	4	P 10a(1×), P 11a2(×) P 11c(1×)
P 12	2. 12. 41	4	P 12a(1×), P 12b(3×)
P 13	6. 1. 42	4	P 7b(4×)
P 14	3. 2. 42	4	P 14a(4×)
14 Proben	15. 9. 41—3. 2. 42	41 Kulturen	22 Typen

Aus der Tabelle 5 geht hervor, dass 41 Coli-Kulturen aus 14 Faecesproben der Versuchsperson P. zu 22 verschiedenen serologischen Typen gehörten. Im Gegensatz zu der Versuchsperson K. war keiner der gefundenen Typen vorherrschend, da fast bei jeder Probe neue Typen gefunden wurden. Der Typ 7 b, der zuerst am 8.10.41 isoliert wurde, tauchte am 6.1.42 wieder auf, wobei alle 4 untersuchten Kolonien zu die-

sem Typ gehörten. Die beiden Proben P 4 und P 5, die keine Coli-Bakterien enthielten, waren zur Zeit einer leichten, schnell vorübergehenden Diarrhoe entnommen worden. Hier befand sich auf den Platten eine Reinkultur von grampositiven Kokken, die nicht näher untersucht wurden. Die Faecesprobe P 6 vom 1.10.41 ergab neben Kokken nur einzelne Coli-Kolonien, die erst in der folgenden Probe P 7 vom 8.10.41 reichlich erschienen.

### *Die O-Antigene der P-Stämme.*

Die Ergebnisse der O-Agglutination sind in der Tabelle 6 dargestellt, aus der hervorgeht, dass es sich um 22 verschiedene Serotypen handelt.

Die Tabelle 6 zeigt, dass die Mehrzahl der P-Seren sehr spezifisch reagierte, da nur einige wenige Seren, wie z. B. das Serum P 8 a, stärkere übergreifende Reaktionen aufwiesen. In allen solchen Fällen, in denen stärkere übergreifende Agglutinationen auftraten, wurden Absorptionsversuche angestellt, die ergaben, dass es sich hierbei nur um gemeinsame, komplex gebaute Partialantigene handelte. Im Gegensatz zu den K-Stämmen befanden sich unter den P-Stämmen keine, die schwach agglutiniert wurden, da sämtliche O-Seren hohe Titer besaßen. Mit Hilfe der O-Agglutination liessen sich 41 P-Stämme ohne Schwierigkeiten in 22 Typen einteilen.

### *Das kulturelle Verhalten der P-Stämme.*

Innerhalb der P-Stämme waren die serologisch verschiedenen Stämme meist auch kulturell von einander verschieden, während die serologisch identischen Kulturen stets dasselbe kulturelle Verhalten aufwiesen.

Mit Hilfe von Adonit, Dulcit, Xylose, Rhamnose, Salicin, Saccharose, des Indol-Nährbodens und der Ferrochloridgelatine liessen sich verschiedene kulturelle Typen aufstellen, die in der Tabelle 7 wiedergegeben sind. Das Verhalten in den übrigen Nährböden geht aus der folgenden Zusammenstellung hervor:

Sorbit	Arabinose	Maltose	Inosit	Lactose	Mannit	Dextrose
+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	— <sup>30</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>
Trehalose	Gelatine	Ammon-Dextrose	Ammon-Citrat			
+ <sup>1</sup>	— <sup>60</sup>	+	—			

Tabelle 6.  
Ergebnisse der O-Agglutination.

100°— Kultur	O-Immunsereen der P-Stämme										
	1a	1c	2a	3a	6a	6b	6c	7a	7b	7d	8a
P 1a	5120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	640
P 1c	0	5120	0	0	20	0	0	0	20	0	0
P 2a	0	0	5120	0	0	0	0	0	0	0	0
P 3a	0	0	0	5120	0	0	0	0	0	40	0
P 6a	0	0	0	0	5120	0	0	0	0	0	0
P 6b	0	0	0	0	0	2560	0	0	0	0	0
P 6c	0	0	0	0	0	0	2560	0	0	40	0
P 7a	0	0	0	0	0	0	0	5120	0	0	0
P 7b	0	20	0	0	0	0	0	0	5120	20	1280
P 7d	0	0	0	20	0	0	40	0	0	5120	160
P 8a	0	0	0	0	0	0	0	0	20	40	5120
P 8b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P 9a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P 9b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
P 9c	0	0	0	0	0	0	40	0	0	20	20
P 10a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P 10b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0
P 11a	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0
P 11c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P 12a	0	0	0	0	0	0	320	20	0	1280	1280
P 12b	0	0	0	0	0	0	20	20	0	0	0
P 14a	0	0	0	160	0	0	40	0	0	80	640

Keiner der Stämme wuchs auf Brillantgrünagar, dagegen üppig auf Agar; Bouillon wurde diffus getrübt. Alle Kulturen bildeten Gas aus Dextrose und Mannit.

Aus der Tabelle 7 geht hervor, dass die 22 verschiedenen Serotypen zu 20 verschiedenen Vergärungstypen gehören, da die Typen P 3 a und P 10 a sowie die Typen P 6 a und P 8 a kulturell einheitlich sind.

Tabelle 6 (Fortsetzung).  
Ergebnisse der O-Agglutination.

1000— Kultur	O-Immunsereen der P-Stämme										
	8b	9a	9b	9c	10a	10b	11a	11c	12a	12b	14a
P 1a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P 1c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P 2a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P 3a	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0
P 6a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P 6b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P 6c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P 7a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P 7b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P 7d	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0
P 8a	0	0	40	0	0	0	0	0	20	0	20
P 8b	5120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P 9a	0	5120	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P 9b	0	0	5120	0	0	0	0	0	0	0	0
P 9c	40	0	0	5120	0	0	0	0	0	0	0
P 10a	0	0	0	20	5120	0	0	0	0	0	80
P 10b	0	0	0	0	0	5120	0	0	0	0	0
P 11a	0	0	0	0	0	0	5120	0	0	0	0
P 11c	0	0	0	0	0	0	0	5120	0	0	0
P 12a	0	0	20	0	20	0	0	0	5120	0	0
P 12b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5120	40
P 14a	0	0	0	40	0	0	0	0	40	0	5120

Zeichenerklärung: Die Zahlen geben die Agglutinationstiter an.  
0 = negativ bei 1:20. Die Agglutinationsreihen wurden  
bei 1:5120 abgebrochen.

### Vergleichende Untersuchungen zwischen K- und P-Stämmen.

Um festzustellen, ob zwischen den einzelnen K- und P-Kulturen serologische Beziehungen bestanden, wurden sämtliche P-Typen in allen K-Seren und sämtliche K-Typen in allen P-Seren agglutiniert, und zwar nur in den O-Immun-

Tabelle 7.  
*Vergärungstypen der serologisch verschiedenen P-Typen.*

Typ	Adonit	Dulcit	Xylose	Rhamnose	Salicin	Saccharose	Indol	H <sub>2</sub> S
P 1a	— <sub>30</sub>	+ <sup>2</sup>	+	+	+ <sup>2</sup>	— <sub>30</sub>	+	—
P 1c	— <sub>30</sub>	—(+)	+	+	+ <sup>2</sup>	— <sub>30</sub>	+	—
P 2a	— <sub>30</sub>	— <sub>80</sub>	+	+	+ <sup>2</sup>	— <sub>30</sub>	+	—
P 3a	— <sub>30</sub>	+	+	+	+ <sup>2</sup>	— <sub>30</sub>	+	—
P 6a	+	— <sub>30</sub>	+	+	+	— <sub>30</sub>	+	—
P 6b	— <sub>30</sub>	— <sub>30</sub>	+	+	—(+)	—(+)	—	+
P 6c	— <sub>30</sub>	+	+	+	— <sub>30</sub>	+	—	+
P 7a	— <sub>30</sub>	+ <sup>3</sup>	+	— <sub>30</sub>	+ <sup>2</sup>	— <sub>30</sub>	+	—
P 7b	— <sub>30</sub>	+ <sup>2</sup>	+	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	— <sub>30</sub>	+	—
P 7d	— <sub>30</sub>	+	+	+ <sup>5</sup>	+	— <sub>30</sub>	—	—
P 8a	+	— <sub>30</sub>	+	+	+	— <sub>30</sub>	+	—
P 8b	— <sub>30</sub>	+	+	+	— <sub>30</sub>	— <sub>30</sub>	+	—
P 9a	— <sub>30</sub>	— <sub>30</sub>	+	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	— <sub>30</sub>	+	—
P 9b	— <sub>30</sub>	+ <sup>3-6</sup>	+ <sup>6-11</sup>	+	— <sub>30</sub>	— <sub>30</sub>	+	—
P 9c	— <sub>30</sub>	+	+	+	+ <sup>6</sup>	— <sub>30</sub>	+	—
P 10a	— <sub>30</sub>	+	+	+	+ <sup>2</sup>	— <sub>30</sub>	+	—
P 10b	+	— <sub>30</sub>	+	+ <sup>2</sup>	+ <sup>2</sup>	— <sub>30</sub>	+	—
P 11a	+	— <sub>30</sub>	+	+	+	+ <sup>7-12</sup>	+	—
P 11c	— <sub>30</sub>	— <sub>30</sub>	+	+	—(+)	— <sub>30</sub>	—	+
P 12a	+	— <sub>30</sub>	+	+	+ <sup>2-3</sup>	— <sub>30</sub>	+	—
P 12b	— <sub>30</sub>	+	+	+	— <sub>30</sub>	— <sub>30</sub>	—	—
P 14a	— <sub>30</sub>	+	+	—(+)	— <sub>30</sub>	— <sub>30</sub>	+	—

Zeichenerklärung: + = positiv nach 1 Tage, +<sup>2</sup> = positiv nach 2 Tagen, —(+)= spät und unregelmässig positiv, zuweilen negativ, —<sub>30</sub> = negativ nach 30 Tagen.

seren. In der Mehrzahl der Fälle bestanden keine übergreifenden Agglutinationen; doch kam es in einigen Fällen zu sehr starken Reaktionen, die in der Tabelle 8 dargestellt sind.

Durch Absorptionsversuche wurde festgestellt, dass von den in Tabelle 8 aufgeführten Typen nur die beiden Typen K 12 a und P 6 c dasselbe O-Antigen besaßen. Dagegen waren die Typen K 14 e und P 3 a im O-Antigen verschieden, ob-

Tabelle 8.  
Übergreifende O-Agglutination.

1000— Kultur	O-Immunseren					
	K 11a	K 12a	K 14c	P 3a	P 6c	P 10a
K 11a	5120	0	0	0	0	80
K 12a	0	5120	160	0	5120	0
K 14c	0	640	5120	5120	5120	0
P 3a	0	0	5120	5120	0	0
P 6c	0	320	20	0	2560	0
P 10a	1280	0	0	0	0	5120

wohl sie gegenseitig sehr stark agglutiniert wurden. Die beiden Typen K 12 a und P 6 c, die dasselbe O-Antigen enthielten, obwohl der Stamm P 6 c vom K 12 a-Serum nur bis 1 : 320 agglutiniert wurde, unterschieden sich kulturell von einander. Ferner besass das mit lebenden Bakterien des K 12 a-Stammes hergestellte Serum ein L-Agglutinin, durch das der lebende P 6 c-Stamm nicht agglutiniert wurde.

In kultureller Hinsicht waren die Vergärungsformeln der Typen K 1 a und P 3 a dieselben; doch gehörten beide Kulturen zu verschiedenen Serotypen. Wir konnten also in keinem Falle denselben Coli-Typ bei beiden Versuchspersonen nachweisen, sodass wir unter 84 Stämmen 32 verschiedene Typen gefunden haben.

#### Über H- und L-Antigene.

Da in dieser Arbeit festgestellt werden sollte, ob in den Faecesproben einer bestimmten Person mehrere, verschiedene Coli-Typen vorhanden waren oder nicht, so genügte die Feststellung verschiedener O-Antigene, da diese allein die Verschiedenheit der betreffenden Typen bewiesen. Ob nämlich diese Typen dann ausserdem noch verschiedene H- oder L-Antigene enthielten, war in diesem Zusammenhange nebensächlich. Handelte es sich dagegen um Stämme mit gleichem O-Antigen und demselben kulturellen Verhalten, so war der



Schluss, dass diese identisch seien, zwar naheliegend, doch nicht sicher bewiesen.

Auf eine nähere Analyse der *H-Antigene* haben wir verzichtet, da diese im allgemeinen schlecht entwickelt und schwierig zu bestimmen waren. Als wir zu Beginn unserer Untersuchungen die Beweglichkeit der Coli-Kulturen an 20 std. Bouillonkulturen bei 37° C. oder Zimmertemperatur prüften, fanden wir fast nur unbewegliche Kulturen oder höchstens einzelne bewegliche Individuen im Gesichtsfelde. Die mit solchen formalinisierten Bouillonkulturen hergestellten Immunseren enthielten gar keine oder nur sehr schwach entwickelte H-Agglutinine, selbst wenn man zur Reagenzglas-Agglutination 5 std. Bouillonkulturen benutzte, die gut beweglich und mit 0,5 % Formalin versetzt waren. Im Laufe der Untersuchungen hatte es sich nämlich herausgestellt, dass es notwendig war, *junge* Bouillonkulturen (ca. 5 Std. 37° C., mit einer Öse einer 20 std. Bouillonkultur beimpfst) zu benutzen, um gut bewegliche Kulturen zu erhalten. Vergleichende Untersuchungen an mehreren Stämmen bei Zimmertemperatur und 37° C., die zu verschiedenen Zeiten vorgenommen wurden, ergaben, dass die Beweglichkeit der Coli-Kulturen in erster Linie eine *Zeitfrage*, also keine Temperaturfrage war. Trotz Berücksichtigung dieser Tatsache war aber ein grosser Teil unserer Kulturen unbeweglich oder schlecht beweglich, sodass wir von einer näheren H-Antigenanalyse Abstand genommen haben.

Betreffs der *L-Antigene* sei auf eine vorhergehende Arbeit von F. Kauffmann verwiesen, in der die Sonderstellung dieser neuen thermolabilen Körperantigene beschrieben ist. Es geht aus dieser Arbeit hervor, dass die L-Antigene bei guter Entwicklung eine O-Inagglutinabilität der lebenden Coli-Kulturen bedingen, und dass Immunseren, die mit lebenden O-inagglutinablen Kulturen hergestellt sind, neben den O-Agglutininen besondere L-Agglutinine enthalten.

Eine völlige O-Inagglutinabilität (bei Reagenzglas-Agglutination mit lebenden Bakterien in O-Seren ab 1:20 verdünnt), wie sie bei Coli-Stämmen aus Cystitis, Peritonitis etc. häufig

angetroffen wurde, war jedoch bei den hier untersuchten Faeces-Stämmen selten. Von 32 Typen waren nur 4 völlig O-inagglutinabel, einige schwach agglutinabel, sodass die O-Titer bei Anwendung lebender Bakterien tiefer lagen als diejenigen, die mit gekochter Bouillonkultur erzielt wurden. Der Nachweis von L-Antikörpern gelang nur bei den 4 Immunsereen, die mit lebenden, O-inagglutinablen Bakterien hergestellt waren, sodass die L-Antigene resp. Antikörper bei der Typenbestimmung unserer Faeces-Coli-Kulturen keine wichtige Rolle spielten und daher ausser Acht gelassen wurden.

### *Besprechung der Ergebnisse.*

In Übereinstimmung mit der Literatur ergaben die vorliegenden Untersuchungen, dass die Coliflora des gesunden Menschen nicht einheitlich ist, sondern aus zahlreichen, verschiedenen Typen besteht, die teils gleichzeitig vorkommen, teils einander ablösen. So wurden bei der Versuchsperson K. aus 14 Faecesproben, die im Laufe eines halben Jahres entnommen waren, unter 43 Kulturen 10 verschiedene Coli-Typen festgestellt. Bei der Versuchsperson P. wurden aus 14 Faecesproben unter 41 Kulturen 22 verschiedene Typen isoliert, sodass hier also die Mannigfaltigkeit der Typen noch erheblich grösser war. Da die K-Typen nicht mit den P-Typen identisch waren, wurden also im ganzen unter 84 Kulturen 32 verschiedene Typen isoliert.

Hierbei ist zu berücksichtigen, dass eine intensivere Untersuchung der einzelnen Faecesproben oder häufigere Untersuchungen wahrscheinlich eine grössere Zahl von Coli-Typen aufgedeckt hätten. Aus äusseren Gründen mussten wir uns aber auf eine begrenzte Anzahl von Kulturen, die kulturell und serologisch untersucht wurden, beschränken.

Bei der Aufstellung von Vergärungstypen leisteten folgende Substanzen gute Dienste: Adonit, Dulcit, Rhamnose, Salicin und Saccharose; hinzu kam die Untersuchung auf Indol- und  $H_2S$ -Bildung. Die Mehrzahl unserer Kulturen bildete Indol, dagegen nicht  $H_2S$ , da von 32 Typen nur 6 indolnegativ und

nur 3  $H_2S$ -positiv waren. Nur 1 Typ verflüssigte spät und langsam Gelatine, sodass keiner der untersuchten Coli-Stämme die Gelatine prompt verflüssigte. Mit Ausnahme eines einzigen Typ erfolgte die Lactosespaltung prompt; doch enthielt dieser Typ sowohl prompt als auch spät vergärende Varianten. Inosit wurde von keinem der geprüften Stämme gespalten. Keiner der Stämme wuchs auf Brillantgrünagar und auf Ammonagar mit Na-Citrat, obwohl es sich in allen Fällen um ammonstarke Kulturen handelte.

In serologischer Hinsicht wurde die Typenzugehörigkeit der Stämme mit Hilfe der O-Antigene bestimmt. Zu diesem Zwecke wurden von allen Typen O-Immunseren hergestellt, die in der Reagenzglas-Agglutination mit gekochten Bouillonkulturen sämtlicher Stämme durchgeprüft wurden. Die Agglutinationsergebnisse wurden dann — soweit es notwendig war — durch gekreuzte Absorptionsversuche kontrolliert, wodurch es in allen Fällen gelang, eine sichere Typendiagnose zu stellen. Die überwiegende Mehrzahl der Typen lieferte bei Immunisierung von Kaninchen O-Seren mit hohem Titer, der meist bei 1:5120 oder darüber lag. 3 Typen wurden jedoch schwach agglutiniert, da die erzielten O-Titer bei 1:160 lagen. Die Objektglas-Agglutination mit lebenden Kulturen zur Identifizierung von O-Antigenen war unzuverlässig, da sie entweder negativ ausfiel oder bei starken Serumkonzentrationen unspezifische Reaktionen ergab. Auf eine nähere Analyse der H- und L-Antigene wurde aus den oben erörterten Gründen verzichtet. Es war nicht die Aufgabe dieser Untersuchung, alle vorhandenen serologischen Typenunterschiede aufzuklären, sondern es war das Ziel, festzustellen, ob in den Faeces eines bestimmten Menschen stets derselbe Coli-Typ vorhanden war oder nicht.

Diese Frage konnte auf Grund kultureller und serologischer Untersuchungen dahin beantwortet werden, dass sich im Darm gesunder Menschen oft mehrere Typen gleichzeitig befinden, und dass mit einem häufigen Wechsel der Coliflora zu rechnen ist. Für die Existenz eines »Individual-Colistammes«, der an seinen Wirt angepasst und für sein Wohlerge-

hen verantwortlich sei, konnte kein Anhaltspunkt gewonnen werden.

In diesem Zusammenhange erscheinen Versuche im Sinne der Mutaflor-Therapie von *Nissle*, bestimmte Coli-Typen dauernd im Darm anzusiedeln, als wenig aussichtsreich, zumal die Ursachen zahlreicher Darmstörungen völlig ungeklärt sind. Die bakteriellen Vorgänge im Darm des gesunden Menschen sind zweifellos sehr komplizierter Natur und bisher noch nicht näher analysiert. Wir wollen daher auch darauf verzichten, aus den Befunden bestimmter Abweichungen, wie sie oben bei vorübergehenden Darmstörungen beschrieben wurden, irgendwelche Schlüsse zu ziehen. Zur Beantwortung dieser Fragen wäre nicht nur eine nähere Kenntnis der Coliflora, sondern auch der übrigen Darmflora, speziell der anaeroben Bakterien, notwendig.

### *Zusammenfassung.*

1. Im Laufe eines halben Jahres wurden die Faeces von 2 gesunden Versuchspersonen je 14mal auf das Vorkommen verschiedener Coli-Typen hin untersucht. Hierbei wurden aus der ersten Versuchsperson 43 Coli-Stämme isoliert, die zu 10 verschiedenen Serotypen gehörten, während 41 Coli-Stämme aus der zweiten Versuchsperson zu 22 verschiedenen Serotypen gehörten. Da diese Typen auch unter einander verschieden waren, wurden im ganzen unter 84 Stämmen aus 2 Personen 32 verschiedene Typen festgestellt.

2. Wir haben es beim gesunden Menschen mit einer mannigfaltigen, stark wechselnden Coliflora zu tun und können oft in einer Faecesprobe gleichzeitig mehrere verschiedene Coli-Typen nachweisen.

### LITERATUR.

- Boivin, A., L. Corre und Y. Lchoult: *Compt. rend. Soc. Biol.* 136, 98, 1942.  
 Jatta, M.: *Z. Hyg.* 33, 185, 1900.

*Kauffmann, F.*: »Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe«, bei Einar Munksgaard, Kopenhagen 1941.

— *Acta path. et microb. scand.* (im Druck).

*Mikkelsen, O.*: »Undersogelser over de hos Mennesket forekommende Former af *Bacterium coli*«, bei Kandrup & Wunsch, Buchdruckerei, Kopenhagen 1927.

*Radzievsky, A.*: *Z. Hyg.* 34, 369, 1900.

*Totsuka, K.*: *Z. Hyg.* 45, 115, 1903.

#### *Nachtrag bei der Korrektur:*

Während des Druckes dieser Arbeit erschien eine Mitteilung von A. Boivin, L. Corre und Y. Lehault (*Compt. rend. Soc. Biol.* 136, 257, 1942) über die Coliflora des gesunden Menschen, die unseren Befunden entsprechende Ergebnisse enthielt.

## SERUM PROTEINS DURING IMMUNIZATION.\*)

By M. Bjørneboe.

(Received for publication April 30th, 1942).

### *Introduction.*

In a previous paper (1), the writer has shown that intensive immunization of rabbits with formalin-killed pneumococci may produce a considerable degree of hyperproteinemia. The method employed in this work was based on the observation that the antibody-globulin production in simultaneous immunization with several pneumococcus types within certain limits is proportional to the number of types. Thus the writer was able to show that the amount of antibody protein produced on immunization with 5 types was about 5 times as great as the amount of antibody formed on immunization with 1 type, when the amount of antigen per type was the same. If during immunization with a single pneumococcus type the dose of antigen per injection is increased, the antibody concentration of the serum will be forced to maximum values relatively rapidly. But, the level of these maximum values does not change with the increasing dose of antigen, being dependent upon the character of the antigen, not on its quantity. So an excessively high antibody concentration of the serum may be obtained only by simultaneous immunization with several antigens.

In the same work, further enquiry was made into the relation between antibody protein and serum protein. It was possible to demonstrate that the antibody production gave rise

---

\*) Supported by a grant awarded me by Kong Christian den Tiendes Fond.

to an increase in the amount of serum protein which, with low antibody concentrations corresponded fairly well to the amount of antibody, while with high antibody concentrations this increase was somewhat less than corresponding to the amount of antibody. In the latter case, then, the normal serum protein was reduced in amount and replaced by antibody protein. In order to look into this phenomenon, fractionation of the serum proteins was carried out after Howe's method, and it was found that the amount of normal globulin in these sera (that is, their total globulin minus the antibody protein) might be reduced to 0 when the antibody concentration was particularly high. In these cases the difference between total globulin and antibody protein might even be negative, *i. e.*, it looked as if the antibody might be contained in the serum albumin fraction. For explanation of this finding the hypothesis was set forth that not all the globulin was determined on employment of Howe's method. For various reasons, moreover, this method seems unsatisfactory — for instance, neither the protein concentration nor  $p_H$  at the precipitation of the globulin are taken into account and it would be rational, therefore, to check up the experimental results by employment of another method for the globulin precipitation.

In the present work a fairly thorough enquiry was made into the behaviour of the serum proteins during the course of an intensive immunization with polyvalent vaccine.

### *Methods.*

The protein analysis on the sera is carried out as follows:

The total amount of protein is determined as the difference between total nitrogen and rest nitrogen. The total nitrogen is determined by microkjeldahl analysis ad modum Brecher (2) on 0.1 cc. of serum. The rest nitrogen is determined after precipitation with trichloroacetic acid (0.5 cc. serum + 15 cc. 5 % trichloroacetic acid) and analysis of the supernatant fluid after centrifuging. Duplicate analyses are made for total N as well as rest N. The globulin analysis is carried out after Henriques & Klausen (3), with duplicate analyses. After this method, which is based on the works of S. P. L.

Sorensen, the globulin is precipitated at 50 % saturation with ammonium sulphate, protein concentration 2.0 % and  $p_H$  5.5. The antibody protein is estimated after Heidelberger & Kabat's method (4), slightly modified (5). This method is based on the fact that the antibody protein combines with the antigen when these two substances are brought to react with each other under suitable conditions. If, for instance, pneumococci with a known protein content are added to a pneumococcal serum, the antibody protein of this serum will combine with the pneumococci; when now the pneumococci are separated by centrifuging, the amount of antibody combined with them can be calculated by determination of their protein content. When the test is carried out with suitably large amounts of pneumococci, it is possible, in this way, to absorb and, thus, to measure the total antibody content of a serum.

In the work here presented the estimation of the antibody protein in pneumococcal sera was carried out with the following technique:

#### *Preparation of the Pneumococcus Suspension for Immunization and Assay.*

The pneumococcus culture is made as given by Kauffmann, Bjorneboe & Vammen (6). After cultivation for 6—7 hours, the pneumococci are killed by addition of formalin, 2 % of a 40 % formaldehyde. After centrifuging the pneumococci are washed several times with 0.9 % salt solution. The suspension is stored at 4° with an addition of 0.01 % merthiolate.

#### *Determination of the Antibody Protein.*

To a given amount of serum, pneumococci are added in excess — that is, the protein content of the pneumococci must exceed or equal the antibody protein content of the serum. After 5 minutes the mixture is centrifuged, the sediment is washed twice with 0.9 % saline, and then submitted to a Kjeldahl analysis. The nitrogen content of the pneumococci is subtracted from the nitrogen value obtained in this analysis giving the figure for the nitrogen content of the antibody protein combined with the pneumococci. Multiplication of this figure by 6.25 gives the amount of antibody protein. In order to make sure that all the antibody has combined with the pneumococci, the test is repeated with the supernatant fluid from the centrifuging. The amount of antibody protein that possibly may be found in this way is added to the amount obtained in the first experiment. The given quantitative proportion between pneumococci and antibody will nearly always result in fixation of the total



antibody content of the serum. Variations of the temperature between 4 and 37° plays but a very slight role in the process. The experiments reported here were carried out at a temperature of about 20°. Variations in  $p_H$  between 5 and 9 are of no significance to the outcome of the experiment. In the experiments reported here,  $p_H$  has always been between 6 and 8. The quantities of serum and pneumococci are adjusted so that the amount of nitrogen for the Kjeldahl analysis is 1—2 mg.

Experimental error: The standard deviation on determinations of 14 mg. antibody protein is found to be 0.35. It is decreasing with smaller amounts, being 0.30 for 5 mg. of antibody protein, and 0.10 for 1 mg.

In the present work some determinations were also made on the antibody protein content of *Salmonella* sera, showing that it is practicable to employ exactly the same technique for such determinations on these sera as on the pneumococci sera — with the one exception, that in order to get all the antibody combined with the bacteria, it was necessary to employ about 3 times larger quantities of bacteria in proportion to the amounts of antibody as was used in assays of pneumococcal sera.

### *Plan of Experiments.*

In the main experiment, a large and uniform group of rabbits were immunized with polyvalent pneumococcal vaccine. At regular intervals during the immunization, a rabbit was bled, killed and autopsied. The serum and organs were examined chemically and histologically.\*) Subsequently, similar studies were carried out in 2 smaller experimental series, covering immunization with polyvalent *Salmonella* vaccine and immunization with a mixture of heterologous proteins.

#### *A. Immunization with Polyvalent Pneumococcal Vaccine.*

This experiment was carried out with 50 rabbits of the Serum Institute's own breed (race: white Danish country rabbit). At the commencement of the experiment, the rabbits

---

\*) The histological findings will be reported in a subsequent paper by M. Bjorneboe and H. Gormsen.

weighed 2000—2100 g., and were 8—10 weeks old. During the experimental period their feed consisted in beets, hay and a little oats. Of these rabbits, 40\*) were immunized while 10 acted as controls. The pneumococcal vaccine consisted in a mixture of equal parts of the pneumococcus types: 6, 9, 11, 13, 15, 17, 22 and 23. The density of the vaccine was about  $10^9$  per cc. The initial dose of this vaccine was 2 cc., while all subsequent doses were 4 cc. On the 15th day, however, the octuple dose was given by mistake:  $32 \times 10^9$  pneumococci. The injections were given intravenously, in the ear vein, every other day at 9—10 a. m. At suitable intervals during the immunization — at first, daily, a rabbit was bled to death under ether anesthesia, by division of the carotid artery. This was done at 2—3 p. m. After coagulation of the blood, the serum was separated by centrifuging and stored at  $4^\circ$ , with addition of 0.01 % merthiolate.

### *Results.*

The results are given in Table 1.

Fig. 1 illustrates the behavior of globulin during the immunizing process. The ordinate gives the globulin concentration; the abscissa, the immunizing time. Each point corresponds to one animal. The globulin concentration is seen to have been lowered a little during the first days. On the 9th day an abrupt rise in the globulin concentration sets in, and throughout the rest of the immunization period it keeps at a very high level, up to 5 times the normal concentration.

It is to be kept in mind that the great variations in the form of the curve are due, in part, to individual variations in the animals, as each point of the curve corresponds to one animal, and partly to variations resulting from the progress of the immunizing process. It will be noticed that the globulin concentration after the discontinuance of the immunization is normal. How soon this fall to the normal level takes place

---

\*) 9 of the animals died during immunization.

Table 1.

Data of rabbits immunized with polyvalent pneumococcus vaccine.

No.	Immunization day*)	Vaccine injected cc.	Protein %	Albumin %	Globulin %	Antibody-protein %	Globulin minus antibody protein
2042	normal (0)**)	0	4,68	3,63	1,05	0	—
2052	1	2	4,36	3,98	0,38	0	0,38
2053	2	2	5,73	4,96	0,77	0	0,77
2054	3	6	6,31	5,59	0,72	0	0,72
2055	4	6	4,99	4,45	0,54	0	0,54
2056	5	10	4,22	3,57	0,65	0	0,65
2057	6	10	4,93	4,06	0,87	0	0,87
2058	7	10	5,07	3,73	1,34	0,13	1,23
2059	8	14	4,96	3,72	1,24	0,17	1,07
2043	normal (8)	0	5,04	4,13	0,91	0	—
2060	9	14	5,68	4,28	1,40	0,17	1,23
2061	10	18	4,61	0,50	4,11	0,26	3,85
2062	11	18	5,98	0,63	5,35	1,38	3,97
2063	12	22	5,60	3,30	2,30	0,99	1,31
2064	13	22	6,94	2,78	4,16	2,59	1,57
2065	14	22	6,20	3,05	3,15	1,41	1,74
2044	normal (15)	0	6,09	4,59	1,50	0	—
2066	16	54	6,18	3,89	2,29	0,74	1,55
2067	18	54	6,19	3,93	2,26	1,08	1,18
2068	20	58	9,65	3,27	6,38	4,27	2,11
2069	23	62	10,03	2,96	7,07	6,16	0,91
2045	normal (24)	0	5,82	4,49	1,33	0	—
2070	26	66	9,01	4,03	4,98	3,02	1,96
2071	27	66	7,82	3,58	4,24	2,68	1,56
2073	29	70	6,31	3,25	3,06	1,98	1,08
2074	30	70	7,21	3,29	3,92	2,93	0,99
2076	31	74	7,95	2,28	5,67	4,72	0,95
2046	normal (32)	0	6,45	4,65	1,80	0	—
2077	34	78	7,38	3,70	3,68	2,43	1,25
2047	normal (40)	0	6,68	5,35	1,33	0	—
2082	41	90	7,54	3,16	4,38	2,75	1,63
2083	47	102	6,16	2,63	3,53	2,43	1,10
2048	normal (48)	0	6,91	5,06	1,85	0	—
2084	68	120	6,94	4,25	2,69	1,91	0,78
2049	normal (69)	0	6,39	4,74	1,65	0	—
2086	82	144	7,29	3,48	3,81	2,54	1,27
2050	normal (83)	0	6,68	5,09	1,59	0	—
2087	92+ 57 days' rest	164	5,45	4,51	0,94	0,11	0,83
2089	92+ 80 days' rest	164	5,23	3,99	1,24	0,07	1,17
2091	92+111 days' rest	164	6,66	4,79	1,87	0,06	1,81
2051	normal (203)	0	6,38	5,19	1,19	0	—

\*) that is the day, reckoned from the start of the test, on which the blood was drawn.

\*\*) The number in brackets after »normal« indicates the day on which the blood was drawn, reckoned from the start of the test.

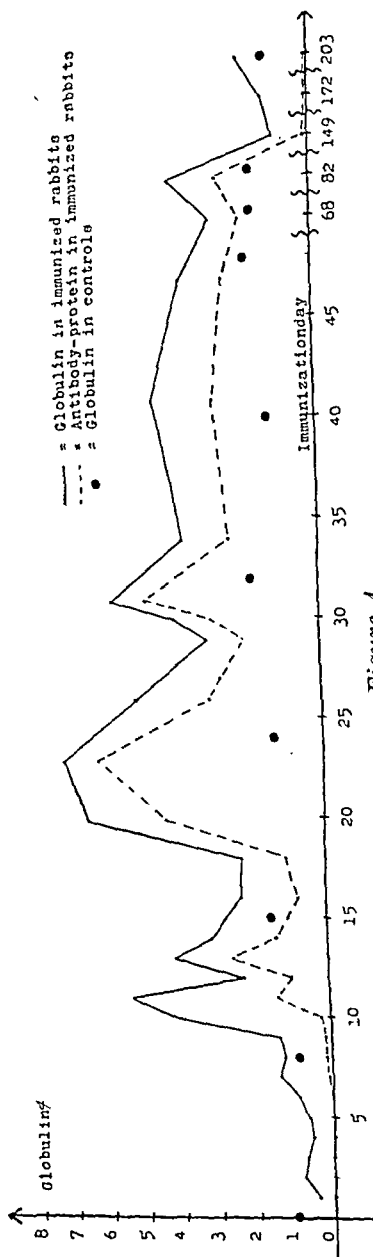


Figure 1.  
Serumglobulin and Antibody-protein during Immunization with polyvalent Pneumococcus-vaccine  
(Immunization was discontinued after 92 days).

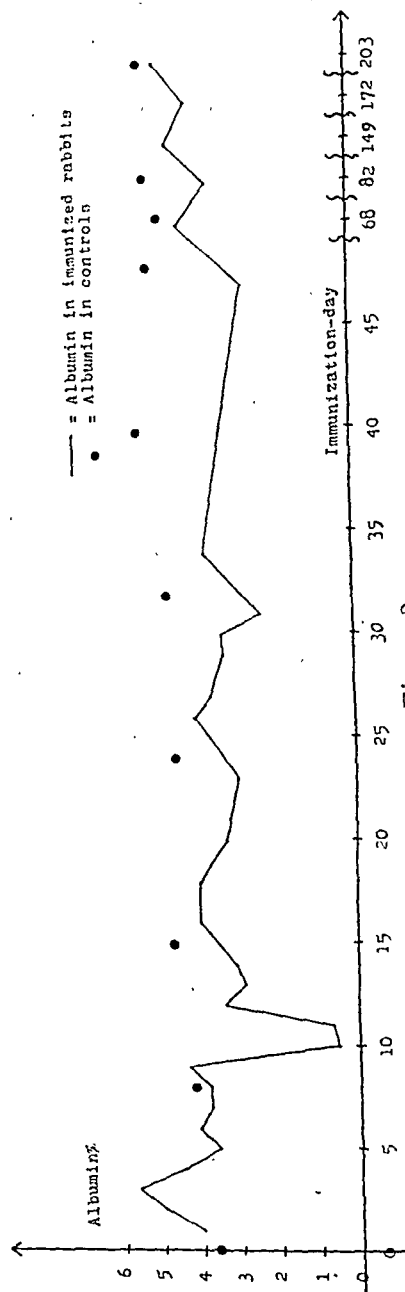


Figure 2.  
Serumalbumin during Immunization with polyvalent Pneumococcus-vaccine  
(Immunization was discontinued after 92 days).

cannot be seen from this curve. In some special experiments the normal globulin concentration was reached in 2—3 weeks after discontinuance of the immunization.

The stippled curve in Fig. 1 illustrates the behaviour of the antibody globulin. It shows that small amount of antibody can be demonstrated on the 7th day of immunization. From the 10th day the concentration increases markedly and follows the variations in the globulin concentration, although the distance between these two curves is somewhat variable. It will be noticed that only two points on the antibody curve are found at a considerable distance from the globulin curve — namely, corresponding to the 10th and 11th days of immunization — that is, corresponding to the first marked increase in the globulin concentration. The significance of the relation between the globulin curve and the antibody curve will be discussed below.

The behavior of the serum albumin during the immunization is illustrated in Fig. 2, which shows that, after rising slightly for a few days, the albumin concentration falls off again, and then it keeps at a subnormal level throughout the immunization. After discontinuance of the immunization it again reaches the normal level. The relation of albumin to globulin will be discussed below.

Non-protein nitrogen values were the same in immunized animals and in controls, on an average 0.36 mg N per cc.

### *B. Immunization with Polyvalent Salmonella Vaccine.*

The immunization was carried out with a vaccine consisting of equal parts of the following *Salmonella* cultures: *Salmonella* senftenberg, *S. hvittingfoss*, *S. aberdeen*, *S. kirkee*, *S. cerro*, *S. poona*, *S. onderstepoort*, *S. urbana*. These *Salmonella* types were selected because they all differ as to O antigens. The cultures are grown on agar plates and then suspended in saline and killed by addition of formalin. Prior to the immunization the vaccine is diluted to a density of about  $1.4 \times 10^9$  bacteria per cc. The vaccine was kindly furnished us by Dr. F. Kauffmann.

The experiment was carried out with 10 rabbits of the Serum Institute's own breed (race: white Danish country rabbits), 7 of which were immunized while 3 acted as controls. At the commencement of the experiment the animals weighed 2800—3000 g., and were 8—9 months old. Their feed consisted in beets, grass and a little oats. The injections were given intravenously, one dose of vaccine every other day. The initial dose was 0.02 cc., whereafter the dosage was increased by 100 % at each injection, up to 2 cc. This dosage was then maintained for a little over two months. Each animal was given altogether 40 cc. of vaccine (but No. 8 received only 36 cc.). The animals were bled and autopsied as in Experiment A. The analyses for serum protein and antibody protein were likewise carried out as in Exp. A — in the case of antibody protein, however, with the modification mentioned under *methods*.

### Results.

The results are recorded in Table 2 from which it will be noticed that they are similar to the ones obtained by the pneumococcal immunization: An enormous rise in the glo-

Table 2.  
*Data of rabbits immunized with polyvalent Salmonella vaccine.*

No.	Protein %	Albumin %	Globulin %	Antibody protein %	Globulin minus antibody pro- tein
1*)	5,46	4,88	0,58	0	—
2*)	5,51	4,74	0,77	0	—
3*)	6,41	4,91	1,50	0	—
8	7,89	3,79	4,10	3,16	0,94
9	6,26	3,93	2,33	0,97	1,36
10	7,11	4,68	2,43	1,44	0,99
12	10,13	2,27	7,86	6,38	1,48
13	7,58	4,21	3,37	2,56	0,81
14	9,11	3,88	5,23	4,44	0,79
15	6,95	3,85	3,10	1,97	1,13

\*) control.

bulin concentration in the immunized rabbits, and a fall in the albumin concentration. Also the antibody concentration reaches considerable values and, as in Exp. A, it appears to follow the globulin concentration rather closely. These animals were not examined until they had been immunized for about 4 months, but serum analyses performed 5—6 weeks before this time showed even then a considerable rise in the globulin concentration, and it may be that this marked rise has set in even at an earlier date.

### *C. Immunization with Several Heterologous Proteins.*

In this experiment a mixture of horse, sheep and ox serum was used for the immunization. The sera were mixed so that the mixture contained equal amounts of horse, sheep and ox protein. The protein concentration of the mixture was 4.81 %, in which albumin made up 2.19 %, globulin 2.62 %. Altogether 13 rabbits of the abovementioned breed were employed for this experiment, 10 for the immunization, 3 for control. At the commencement of the experiment the rabbits weighed 2800—3000 g., and were 8—9 months old. The feed consisted in beets, grass and a little oats. The injections were given intravenously every other day, commencing with a dose of 0.1 cc. and increasing gradually to 0.6 cc., whereafter this dosage was continued for nearly two months. After this, some of the animals were immunized further with single doses of 3 cc. The bleeding, autopsy and protein analyses were carried out as in Exp. A and B. No antibody analyses were performed in this experimental series.

### *Results.*

The results are recorded in Table 3, which shows that a marked rise in the globulin concentration of the serum was obtained only in 2 cases: in No. 30 and No. 37. In the other animals the globulin concentrations were normal or only slightly increased in relation to the findings in the controls.

Table 3.

*Data of rabbits immunized with horse, ox and sheep proteins.*

No.	Immunization time days	Protein injected cg	Protein %	Albumin %	Globulin %
26	*) —	—	5,16	4,68	0,48
27	**) —	—	6,22	4,71	1,51
28	***) —	—	6,28	5,31	0,97
29	59	44,6	6,43	4,66	1,77
30	59	44,6	7,18	4,40	2,78
31	61	44,6	5,32	4,71	0,61
32	61	44,6	5,85	4,34	1,51
34	81	93,6	6,56	4,23	2,33
35	82	93,6	5,80	4,38	1,42
36	82	93,6	7,38	5,11	2,27
37	88	93,6	7,70	4,59	3,11
38	88	93,6	7,29	4,88	2,41
39	88	93,6	7,03	5,30	1,73

\*) Blood drawn after 61 days.

\*\*) " " " 61 "

\*\*\*) " " " 88 "

In rabbits Nos. 30 and 37 the increase in globulin cannot conceivably be due to the heterologous globulin injected — as is evident from the following calculation. These two animals received respectively 24.3 and 51.1 cg. of globulin. Setting the serum volume of the rabbits at about 100 cc., and supposing that all the successively injected globulin was accumulated (which is not very likely) it is easy to figure out that the highest conceivable globulin concentration that might have been produced by the heterologous globulin is respectively 0.24 % and 0.51 %. From Table 3 it will be noticed that these concentrations are considerably smaller than the increase observed in No. 30 and No. 37. So it seems reasonable to assume that at least part of the increase in these two animals has been due to antibody protein.

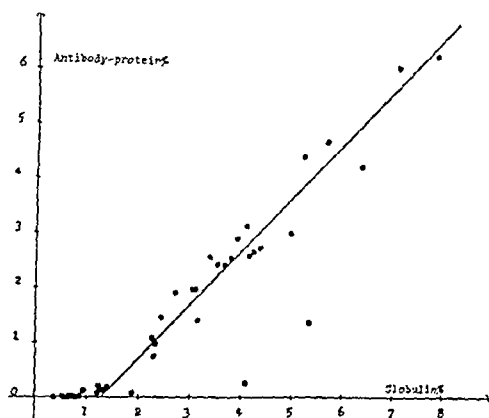


In this experiment the albumin concentration was either normal or, in a few cases, slightly decreased.

### *Discussion.*

#### *I. Serum Globulin and Antibody Protein.*

Both experimental series A and B presented the striking fact that the globulin and antibody concentrations of the serum showed a tendency to run parallel, high antibody con-



*Figure 3.*

The relation between Serumglobulin and Antibody-protein.

centrations being accompanied by high globulin concentrations and low antibody concentrations by low globulin concentrations. This finding is further elucidated in Fig. 3, in which all sera in A and B from immunized animals are depicted so that the ordinate represents the antibody protein, while the abscissa gives the globulin concentration. A line is drawn at an angle of  $45^\circ$ , and it crosses the abscissa at 1.3. It will be noticed that all the points except for 2 (Nos. 2061 and 2062 in Exp. A) are grouped round this line. This means that, with the two exceptions mentioned, all these points comply with the formula: Globulin concentration — 1.3 = antibody concentration, or, as 1.3 corresponds to the normal

serum globulin concentration: *the antibody formation is entirely an extra production of globulin.*

This finding has been checked up as follows. Calculation of the average globulin concentration in the controls in Exp. A and B gives 1.31 % (standard deviation 0.39). Calculation of the average normal globulin concentration in the immunized animals in the same experiments (*i. e.*, the difference between the total globulin and antibody globulin) gives 1.30 % (standard deviation 0.74). The difference between these two figures (1.30 and 1.31) is not significant.

The standard deviation of the values obtained for the immunized animals — 0.74 — is rather large. This is due in part to the fact that the two animals, Nos. 2061 and 2062, showed a strikingly high concentration of normal globulin; and, presumably it is due in part to the circumstance that the magnitude of the normal globulin concentration in the immunized animals is calculated as the difference between total globulin and antibody protein. For, in this way, the error in the determination of both these two figures will assert itself in the standard deviation. In the controls the globulin concentration is measured directly, and hence it is more accurate.

It looks as if the concentration of normal globulin in the 7 adult immunized rabbits in Exp. B is somewhat lower than that observed in the young animals in Exp. A (averaging 1.07 in Exp. B, as against 1.35 in Exp. A). Something similar applies to the controls in the two experiments (average of 0.95 in Exp. B, as against 1.42 in Exp. A). Owing to the small number of animals in Exp. B, however, nothing definite may be said about this apparent difference.

From the findings in these experiments it seems justified to conclude that the antibody formation is entirely an extra production of globulin, provided that the globulin is measured after Henriques and Klausen's method. It is to be emphasized that this rule has been found to hold true even for very wide variations in the antibody concentration, probably as large as they will ever be found.

In Exp. A, 2 animals, Nos. 2061 and 2062, differed distinctly from the others by showing a very wide divergence between the globulin concentration and the antibody concentration. Another striking feature in these two animals is their very low albumin concentration. These facts may conceivably be explained in various ways. A technical mishap may have happened to these sera, denaturing the serum proteins in the preparation. This would increase the »globuline« concentration at the expense of the »albumin« concentration. Or a part of the globulin in these two sera might really be antibody which, on account of its low avidity for the antigen, could not be measured after the method here employed. It has been demonstrated previously by Heidelberger and Kendall (7) and by Bjørneboe (8) that in the beginning of the immunization, under certain experimental conditions, the avidity of antibody protein for antigen is not the same as later on, suggesting that the reactivity of the antibody is lower at first than later on. Consequently it seems quite conceivable that some »antibody« at a very early stage of the immunizing process might not at all combine with the antigen in any measurable degree. Finally, in the beginning of the immunization the antigen might conceivably give rise to an increased production of *normal* globulin.

It has long been known that immunization is associated with an increase in the globulin concentration of the serum; and previously, too, this globulin increase has been attributed to the antibody formation. Still, the prevailing view has been the one advanced by Marrack in 1938 (9), on the basis of his review of the older and more recent literature: A new-formation of globulin appears to take place in response to antigenic stimulation, but only a part of this globulin is able to react with the antigen. The older authors did not think there was any particular connection between the increase in globulin and antibody formation, because no proportionality was found between the rise in globulin and the antibody effect. Previously, however, the writer (10) has demonstrated that with pneumococcal antibody the effect per gram of anti-

body differs at various points of time during the immunization. So the absence of any proportionality between the globulin increase and the antibody effect does not prove that these two phenomena have nothing to do with each other.

In recent years a few authors have investigated this problem by employment of quantitative chemical methods for estimation of the antibody. Boyd and Bernard (11) state that the increase in globulin (during immunization) is greater than the amount of antibody produced, but has a tendency to run parallel with the latter. Liu, Chow and Lee (12) hold that usually less than one-half — and up to two-thirds at the most — of the increase in globulin in rabbit serum under immunization with pneumococci is due to antibody formation. The divergence between these two works and the findings presented in this paper is presumably due to differences in the methods employed for estimation of the antibody — that is, as far as Boyd and Bernard are concerned. These authors did not employ Heidelberger's original methods. The work reported by Liu, Chow and Lee has been accessible to the writer only as a brief abstract in which the methods were not given.

In a previous work (1) in which the writer employed Howe's method for determination of globulin, it was found that the difference between the total globulin concentration and the antibody protein concentration in an immune serum might be 0 or negative, *i. e.*, that all the globulin — and possibly some of the albumin, too — might be present in the form of antibody. From these findings the writer arrived at the conclusion that with Howe's method not all the globulin present in the serum was determined, since the antibody was proved conclusively to be a globulin. With the method employed in the present work, in which the globulin is precipitated at a protein concentration of 2 % and at  $p_{H}$  5.5, the antibody has been found to be entirely an extra production of globulin — a result which, at any rate, is not in conflict with our knowledge about the nature of the antibody. The establishment of the conditions under which the

globulin determination on the serum has to be carried out is to some extent a matter of definition. The writer prefers to employ Henriques' and Klausen's method, because it accurately gives *all* the essential conditions for the precipitation of globulin, and because, with this method, the writer has been able to obtain some results that are in no conflict whatever with our knowledge of the nature of antibodies.

## II. Relation between Albumin and Globulin.

In Exp. A and B it was a striking feature that high globulin concentrations were accompanied by low albumin concentrations and vice versa. It will be appropriate now to discuss this fact.

In Fig. 4, all the protein analyses in Exp. A, B and C

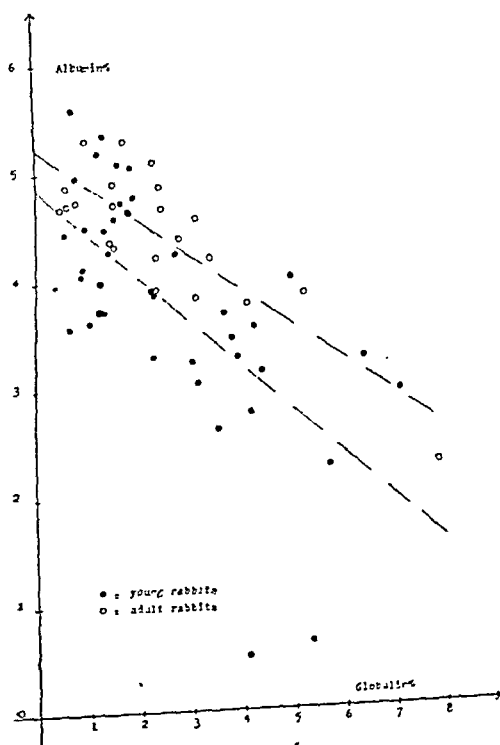


Figure 4.  
The relation between Serumalbumin and Serumglobulin.

are plotted so that the abscissa represents the globulin, while the albumin is put down as the ordinate. The animals employed in Exp. A — all young rabbits — are recorded as black spots, while the animals in Exp. B and C, which were all adult rabbits, are represented by circles. It will be noticed that with two exceptions (Nos. 2061 and 2062) the plotted points from Exp. A are grouped round the straight line even though their dispersion is rather wide. Calculation of the formula for this line after the method of least squares gives the equation:  $2.45 A + G = 11.88$ . The points from Exp. B and C are grouped round a line, the formula of which, calculated after the same method, is:  $3.11 A + G = 16.23$ .

So there is a relation between the albumin concentration and the globulin concentration, differing a little for young animals and for adult. In Fig. 4, in which the deviation from this relation is indicated by the dispersion of the points round the line, the form of the two curves illustrates how the two phenomena vary in relation to each other. The simplest explanation of this finding is that the relation is an expression for a regulatory mechanism that keeps the colloid-osmotic pressure constant or, at any rate, varying only within certain limits. Presumably the molecular weight of globulin for the rabbit, as in other mammals, is 2—3 times as large as the molecular weight of albumin (13). So, if the sum of the osmotic pressure of albumin and globulin is to be kept fairly constant, the relation between the albumin concentration and the globulin concentration will naturally be expected to turn out just as expressed in the two equations cited above.

If this conception of the relation between albumin and globulin be correct, the fall in albumin concentration during immunization as observed in our experiments may be explained simply in this way: It is secondary to the increase in globulin and dependent upon the aforementioned regulatory mechanism.

As far as the writer has been able to find out, the above-mentioned quantitative relation between the albumin concentration and globulin concentration of serum has not been

observed previously — probably because it has not been practicable before to produce such great variations in the magnitude of these two elements. In conclusion it is to be pointed out that in all probability it will be possible, by means of experiments like those here reported, to investigate where in the organism the regulatory mechanism for the colloid-osmotic pressure is located.

### *Summary.*

A large uniform group of rabbits were immunized intensively with polyvalent pneumococcal vaccine. At short intervals during the immunization, a rabbit was bled to death and the serum analyzed with regard to globulin concentration and antibody protein concentration. The globulin analyses were carried out after Henriques' and Klausen's method. Antibody protein was determined after Heidelberger and Kabat's method, slightly modified. Similar studies were carried out on a group of rabbits that were immunized with polyvalent Salmonella vaccine. Finally, globulin-albumin analyses were carried out on a group of rabbits that were immunized with a mixture of heterologous proteins.

These experiments gave the following results:

Immunization with polyvalent pneumococcus and Salmonella vaccines gives rise to a considerable increase in the serum globulin concentration: up to 7 times the normal concentration. When the globulin is measured after Henriques' and Klausen's method this rise in globulin concentration can be shown to be identical with the antibody protein.

Immunization with several heterologous proteins produces in some of the animals (2 out of 10 rabbits) an increase in the globulin concentration that cannot be explained as due to the injected globulin, but presumably is due to antibody formation.

Finally, it is pointed out that the considerable variations in the albumin concentration (A) and globulin concentration (G) during the immunization on the whole follow a definite

formula (for young animals:  $2.45 A + G = 11.88$ ; for adult animals:  $3.11 A + G = 16.23$ ). This is taken as an expression of a regulatory mechanism with the function to keep the colloid-osmotic pressure constant or, at any rate, varying within certain limits.

### Conclusions.

The increase in serum globulin during immunization is identical with the antibody protein, when the globulin is measured after Henriques' and Klausen's method. The fall in serum albumin is secondary to the increase in serum globulin and dependent upon a regulatory mechanism with the function to keep the colloid-osmotic pressure within certain limits.

### LITERATURE.

- 1) Bjørneboe, M.: Z. f. Immunitätsf. 99 245 (1941).
- 2) Brecher, C.: Wiener Klin. Wochschrft. 49 1228 (1936).
- 3) Henriques, V. and Klausen, U.: Biochem. Z. 254 414 (1932).
- 4) Heidelberger, M. and Kabat, E. A.: J. exp. Med. 60 643 (1934).
- 5) Bjørneboe, M.: Studier over Agglutininproteinet i Kaninpnemokoksera. Dissertation Copenhagen 1940 p. 19.
- 6) Kauffmann, F., Bjørneboe, M. and Vammen, B.: Z. Hyg. 121 36 (1938).
- 7) Heidelberger, M. and Kendall, F. E.: J. Exp. Med. 62 697 (1935).
- 8) see 5) p. 115.
- 9) Marrack, J. R.: Medical Research Council. Special Report Series. No. 19, 1938, p. 66.
- 10) see 5) p. 104 and 111.
- 11) Boyd, W. C. and Bernard, H.: J. Immun. 33 111 (1937).
- 12) Liu, S. C., Chow, B. F. and Lee, K. H.: cited from 9) p. 66.
- 13) Schmidt, C. L. A.: Chemistry of Amino acids and Proteins Springfield-Baltimore 1938, p. 334.



## ZUR DEFINITION DER SALMONELLA-GRUPPE.

Von F. Kauffmann.

(Eingegangen bei der Redaktion am 30. April 1932).

Im Jahre 1934 hatte ich auf Grund der damals bekannten Tatsachen folgende Salmonella-Definition gegeben:

»Salmonellabacillen sind gramnegative, sporen- und kapsellose, meist bewegliche Bacillen, die auf den üblichen Nährböden wachsen, die stets Dextrose mit oder ohne Gasbildung spalten, die dagegen Adonit, Lactose und Saccharose bei 30tägiger Bebrütung bei 37° C. nicht angreifen, die Gelatine nicht verflüssigen, die kein Indol bilden und Antigene der Salmonellagruppe enthalten.«

Als dann neue Tatsachen bekannt wurden, die in biochemischer Hinsicht (Lactose, Gelatine, Indol) dieser Definition widersprachen, habe ich alle kulturellen und biochemischen Einschränkungen aus ihr entfernt und im Jahre 1937 folgende Definition gegeben:

»Salmonellabakterien sind gramnegative Bakterien, die auf Grund ihrer Antigenstruktur in das *Kauffmann-White-Schema* eingefügt werden können.«

Da diese Definition Anlass zu Missverständnissen gegeben hat, will ich im folgenden versuchen, meine Auffassung klarer zum Ausdruck zu bringen.

Die Definition von 1937 besagt nur, dass es sich hier um eine serologisch zusammengehörige Gruppe gramnegativer Stäbchen handelt, sie enthält also keineswegs die Aufforde-

rung, Salmonella-Bakterien nur serologisch zu bestimmen oder gar Kokken zur Salmonella-Gruppe zu rechnen, wenn serologische Beziehungen nachgewiesen werden.

Um solche Missverständnisse zu verhindern, will ich die Salmonella-Definition folgendermassen erweitern:

»Zur Salmonella-Gruppe, deren serologische Zusammengehörigkeit im *Kauffmann-White-Schema* zum Ausdruck kommt, werden verschiedene Typen gramnegativer Bakterien gerechnet, die durch bestimmte kulturelle, biochemische und serologische Eigenschaften gekennzeichnet sind.«

Man kann leider keine nähere Definition dieser Gruppe geben, da es sich nicht um eine scharf abgegrenzte Gruppe handelt, sondern um verschiedene Typen, die aus praktischen Gründen zu einer Gruppe zusammengefasst werden. Wie ich schon an anderer Stelle sagte, gibt es in der Natur keine scharf abgetrennten Bakterien-Gruppen, sondern nur verschiedene *Typen*, die einander näher oder ferner stehen. Deshalb bleibt nichts anderes übrig, als *willkürlich* bestimmte Typen in Gruppen zusammenzufassen, und zwar auf Grund internationaler Vereinbarungen.

### *Zusammenfassung.*

Zur Vermeidung von Missverständnissen wird eine erweiterte Salmonella-Definition gegeben, die folgendermassen lautet:

»Zur Salmonella-Gruppe, deren serologische Zusammengehörigkeit im *Kauffmann-White-Schema* zum Ausdruck kommt, werden verschiedene Typen gramnegativer Bakterien gerechnet, die durch bestimmte kulturelle, biochemische und serologische Eigenschaften gekennzeichnet sind.«

### LITERATUR.

- Kauffmann, F.*: Weichardt's Ergebnisse der Hygiene 15, 219, 1934.  
 — Z. Hyg. 119, 352, 1937.  
 — »Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe«, bei E. Munksgaard, Kopenhagen, 1941.

## STUDIES ON THE SPECIFICITY OF PEMPHIGUS STAPHYLOCOCCI

By *Else Krag Andersen.*

(Received for publication May 8th 1942).

Numerous attempts have been made by means of biochemical as well as serological methods to classify and type the staphylococci, and indeed most of the authors have succeeded in dividing the staphylococci into groups and types. But it has not been practicable to make comparisons between the various typings; nor is this likely to happen before the staphylococcal antigen nomenclature is established — corresponding to what has been done already in the case of the *Salmonella* bacteria and pneumococci.

In 1939 an epidemic of *pemphigus contagiosus neonatorum* made its appearance in the Gynecologic-Obstetrical Department of the Sønderborg State Hospital. This gave rise to a bacteriological examination concerning the pemphigus staphylococci.

Previously the etiology of pemphigus neonatorum was a much disputed question. Some investigators considered the lesion not infections, others ascribed it to streptococci, and others again attributed it to staphylococci, possibly in connection with a virus. According to more recent investigations, however, we have to take it as established that *Staphylococcus pyogenes aureus* is the cause of pemphigus neonatorum — as is shown also by the studies to be presented here. Dr. Juul

Henningsen, who was summoned in his capacity of State Epidemiologist, thought that this epidemic would afford the possibility of a differentiation between staphylococci which produce a typical epidemic lesion limited to the upper layers of the skin and other staphylococci which produce more deep-going lesions or are encountered as saprophytes in the nose or throat.

If such a differentiation might be possible, it would imply the chance of demonstrating pemphigus carriers among the personnel, and thus a possibility of combating an important source of infection effectively.

Previous investigators have not been able to demonstrate any sure difference, serologically or biochemically, between staphylococci cultivated from patients with impetigo, eczema or furunculosis (Lewandowsky (7), Epstein (2)).

After Seedorff's classification of staphylococci, 6 strains of impetigo staphylococci and 2 strains of pemphigus staphylococci were found to belong to Type I, the most frequent type, comprising 67 % of the 170 staphylococcal strains examined, most of which were staphylococci from deeper lesions as abscesses and furuncles. One strain of pemphigus staphylococci belonged to Type XI, comprising 22 % of the staphylococci examined, most of which originated from acne and acute otitis media.

### *The technique here employed:*

*Fermentation of Mannitose.* — One drop of a 20-hour broth culture is transferred to meat extract broth containing  $\frac{1}{2}$  % mannitose, with bromothymol blue for indicator. Reading after incubation for 24 hours at 37°.

*Plasma Coagulation.* — Equal parts of 2 % sodium citrate solution and rabbit blood are centrifuged. The supernatant plasma is distributed in tubes, 1 cc, in each tube. The tubes are inoculated with 1 drop of a 20-hour broth culture. Reading after 4 hours and 24 hours.

*Hemolysis on Rabbit Blood Plates.* — The plates are prepared with 5 % washed rabbit blood corpuscles; first a thin layer of agar is put into the dish; then, on top of this, a thin layer of blood agar. The plates are inoculated with a 20-hour broth culture in such a way that the colonies are located singly. Reading after 18–20 hours' incubation at 37°.

*Production of Immune Sera.* — Rabbits are immunized with formalin-killed antigen suspended to density 8 (Wulff's scale) in 0.1 % formalin-buffer-saline, by intravenous injection every other day for 4—5 weeks, commencing with a dose of 0.1 cc., and increasing the dose to 2 cc. On the 5th day after the last injection, the rabbits are bled to death, and the sera are stored in frozen state.

*Agglutination.* — The slide agglutination test is carried out with a 20-hour agar culture and serum diluted 1:10. The agglutinin titration is carried out with 1) formalin-killed antigen suspended to density 8 in 0.1 % formalin-buffer-saline and 2) trypsin-digested antigen. The latter reagent is prepared by centrifuging 8 cc. of broth culture, and adding to the sediment: 1 drop of phenolphthalein indicator, 2d rops of trypsin emulsion, and 3 drops of n/10 NaOH or sufficient for a strong red color; and this mixture is left standing for 1½ hours at 37°. After centrifuging, the supernatant fluid is pipetted of, and the sediment is suspended in 0.1 % formalin-buffer-saline to density 8. Agglutinin tests are made in the dilutions 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 and 1:1600 the result being read after standing in water-bath at 50° for 20 hours.

*Absorption.* — A formalin culture is used for the absorption. The sediment from 6 cc. of a 50 × density 8 suspension is suspended in 3 cc. of serum diluted 1:10, left standing at 37° for 2 hours, and then in ice-box till next day. In cases where the absorption has not been complete, the test is repeated with the homologous strain for complete absorption.

*Complement Fixation Test.* — This test is carried out with the technique given by Martin Kristensen (6) for gonococcal complement fixation. The antigen dose is determined for each staphylococcal strain, and the complement titer is determined daily for the various doses of antigen selected. The following dilutions have been employed: 1:67, 1:200, 1:600, 1:1800, and 1:5400. Total volume: 0.5 cc.

### *The Pemphigus Epidemic in Sonderborg in 1939.*

Cultures were made from pemphigus bullæ and from the nose and throat of patients, mothers and personnel. Growth of staph. aureus was found in 100 % of the bulla cultures, in 92 % of the nose cultures, and in 77 % of the throat cultures. In the mothers, staph. aureus was found in 74 % of the nose cultures and in 26 % of the throat cultures. Among the personnel, this organism was found in 15 % of the nose

cultures and 18 % of the throat cultures. The criteria of the diagnosis of staph. aureus were fermentation of mannitose and coagulation of rabbit citrate plasma.

In 1939 Cowan (1) divided the pyogenic staphylococci into 3 main types by slide agglutination with sera produced by 3 staphylococcal strains. These 3 strains, 2 furunculosis strains and 5 Sønderborg strains were further investigated now by fermentation tests, animal experiments and serological tests.

The fermentation power of the strains was examined with 30 sugars,  $p_H$  being measured colorimetrically after incubation at  $37^\circ$  for 2, 5, 7, 12 and 20 days. No difference could be demonstrated in the fermentation power of the 10 strains. With 4 strains electrometrical determination was made of the course of the acid production in 2 % glucose broth,  $p_H$  being measured after incubation at  $37^\circ$  for 1, 4, 8 and 16 hours. No difference could be demonstrated between the strains in this respect.

Tests for virulence were carried out on mice with 2 bulla strains and 2 furuncle strains, each strain being injected into  $4 \times 4$  mice, subcutaneously in doses of 50 and 100 million staphylococci, intraperitoneally in doses of 200 and 1000 millions. The mice were autopsied on the 3rd and 5th days. In the mice that were infected subcutaneously the extent of the reaction, redness, pus formation and enlargement of lymph glands were noted. In the animals infected intraperitoneally cultures were made from the heart's blood, liver, spleen and mesenteric lymph gland. No difference in virulence could be demonstrated.

Depilated rabbits were infected by intracutaneous injection as well as by rubbing the culture into the skin, with employment of various staphylococcal strains (injection dose: 0.1 cc. of density 8). The reactions produced by the bulla strains were small and well-defined; the reactions to the other strains were extensive. No reaction appeared after percutaneous infection.

Rabbit immune sera were produced with the above-men-

tioned 10 strains; and agglutination tests and absorption experiments were performed. In spite of repeated attempts with modifications of the technique, clear-cut results could not be obtained. Some agglutinations were granular, others floccular; some were quick in their appearance, others slow. Finally, there was the annoying drawback that the antigens of the formalin-killed bulla strains were self-agglutinating. Classification ad modum Cowan could not be carried through even with the technique given by him — owing to overlapping agglutination. Still, the writer succeeded in finding a »bulla serum« which on absorption with a certain furuncle strain yielded a specific »bulla serum« that gave distinct and rapid agglutinations, especially in the slide tests. With this serum all the Sønderborg strains have been examined, besides 22 staphylococcal strains isolated from material received for the preparation of autovaccine. All the bulla strains gave specific agglutination, and so did some of the nose and throat strains from patients and mothers, but none of the strains from the personnel, and only one of the autovaccine staphylococcal strains.

*As a result of these preliminary studies it could be established that all the bulla staphylococci from this epidemic were identical and different from the staphylococcal strains usually encountered.*

With a view to a possible change of phase, numerous solitary colonies were examined by the slide test as well as titration agglutination. In the slide test they all gave a strong reaction with the specific serum. On titration agglutination one colony showed a very low titer. Subcultures were made from this colony, and a new crop of colonies were examined. Among these daughter-colonies, too, only one was found to show a low titer.

As a sharp differentiation of staphylococci by means of agglutination and absorption had proved very uncertain, experiments were made with complement fixation. In 1925 Julianelle (5) had found complement fixation unsuitable for classification of staphylococci, and in 1937 Hegemann (4)

arrived at the same conclusion. In 1925, on the other hand, Seedorff (12) divided 170 staphylococcal strains into 13 well-defined serological types, absorbing the serum with living washed bacteria. In my experiments the complement fixation method was found to give clear-cut results when the experiment was adjusted very carefully, and the absorption carried out with formalin-killed bacteria — as gently as possible. Absorption with living bacteria resulted in pronounced self-inhibition, *i. e.*, the bacteria combined with complement also in the absence of specific antibody. *All the bulla strains proved to be identical and to contain more antigens than the other examined staphylococcal strains of the aureus type.*

On agglutination and complement fixation without absorption, all the staphylococcal strains reacted with each other, without any particularly great difference in titer.

In passing, it is to be mentioned briefly that during the task of suspending some pemphigus strains, I was infected myself by getting a little stain on the cheek. A bullous eruption appeared, and it proved rather refractory. Before I had paid any particular attention to it, I happened to transmit the infection to another person through a hand-shake. The specific pemphigus staphylococcus was isolated from both of us.

### *The Pemphigus Epidemic in Sønderborg 1941.*

On the basis of the gained experiences a new epidemic of pemphigus in Sønderborg was investigated more thoroughly. The material from this epidemic was collected from July 22nd to December 31st, and it comprised:

26 bulla cultures from	26 patients
67 nose and throat cultures from	42    »
58    »    »    »    »    »	29 mothers of patients
714    »    »    »    »    »	90 functionaries.

The cultures were made with cotton swabs on blood agar slants (after the condensation water had been pipetted off),



an even spread being made all over the agar surface. After this, the tubes were at once sent to the State Serum Institute, where agar plates were inoculated from the primary tubes by rubbing the lower third of the agar slant with a new cotton swab, and then make a few slight streaks on the agar plate with the swab. In order to get the colonies absolutely separate, additional spreading was made on the agar plate with an angular glass rod. After incubation at 37° for 24 hours, a comparison was made of the numerical proportion of staphylococci on the upper part of the blood agar slant and on the agar plate. Naturally it is of the greatest importance to the cultural results that the primary cultures are made as carefully as possible. So I wish here to give my best thanks to Dr. Sparrevohn, Sonderborg, for the excellent primary cultures.

Various investigations on the capacity of the staphylococci for hemolysis have given somewhat divergent results. Nöggerath (8) designated the staphylococci capable of hemolysis on rabbit blood plates as pathogenic, the non-hemolytic as non-pathogenic. Schottmüller (11) found some pathogenic strains that did not give hemolysis, but he used blood plates made with human blood. Julianelle (1922) found that all staphylococci, regardless of their origin, gave hemolysis on rabbit blood plates if only they were under observation sufficiently long. This was confirmed in 1938 by Flaum (3), who further found that only about 50 % of the staphylococci isolated from infectious processes and none of the non-pathogenic staphylococci formed hemolysin in fluid culture media, although they all gave hemolysis on rabbit blood plates. Other authors have previously pointed out the difference in the hemolysin production of the staphylococci on blood plates and in fluid medium.

In the work here presented the hemolytic power of the staphylococci was tested against rabbit and sheep corpuscles in cultures on thin plates containing 5 % washed blood corpuscles and consisting of two layers: a very thin layer of agar, and, on top of this, a thin layer of blood agar. These

plates proved preferable to ordinary 5 % blood plates. The hemolysis was read after incubation at 37° for 18—20 hours.

The results are recorded in Table 1.

All the bulla staphylococci failed to produce a clear hemolysis on rabbit blood plates within this length of time (18—



*Fig. 1.*

Hemolysis on rabbit blood plate by pemphigus staphylococci, on the upper half of the plate, and ordinary staphylococci, on the lower half.

20 hours), whereas other staphylococci showed this phenomenon in varying degrees. Fig. 1 shows nose and throat cultures on rabbit blood plate with growth of pemphigus staphylococci and ordinary staphylococci respectively. The colonies of pemphigus staphylococci are seen to be surrounded by a slightly clearing zone, whereas the other staphylococcal colonies are surrounded by a distinct zone of hemolysis. As transitions between these two phenomena may occur, hemolysis on rabbit blood plates may be considered only an orientating test in the diagnosis of pemphigus staphylococci. No

distinction could be made between pemphigus staphylococci and other staphylococci by means of the hemolysis on sheep blood plates.

The hemolysin formation in fluid medium was examined by titration and by employment of the »micromethod« in ordinary 20-hour broth cultures and in 6-day broth cultures grown in a 20 % CO<sub>2</sub> atmosphere. With the latter method of cultivation the carbon dioxide prevents the reaction of the medium from becoming alkaline, thus affording better conditions for the formation of  $\alpha$  hemolysin (Parker, Hopkins & Gunther (9) 1926; Flaum (3) 1938).

The »micromethod« is carried out as follows: Equal parts of a broth culture and a 5 % suspension of washed rabbit corpuscles are mixed in dwarf tubes. The mixture is incubated at 37° for some hours, whereafter the hemolysis is read.

Table 1.  
*Hemolytic Properties of Various Pemphigus and Ordinary Staph. Aureus Strains.*

		1	2	3	4
Sønderborg pemphigus pt.	Throat culture	17 A	0	0	0
»	»	30 Bl.	0	0	0
»	»	40 Bl.	0	0	0
»	»	41 Bl.	0	0	0
»	»	52 Bl.	0	0	0
Haderslev	»	H 2	0	0	0
»	»	H 20	0	0	0
Staph. aureus isolated from impetigo		I 3	0	0	0
Sønderborg personnel.	Nose culture	10 B	+	0	0.003
»	»	14 B	+	0	0.05
»	Throat culture	22 A	+	0	0.1
»	Nose culture	29 B	+	0	0.2
»	»	20 B	+	0	0.05
Autovaccine staphylococcus		A 636	+	0	0.025
»	»	A 647	+	0	0.1
»	»	A 648	+	0	0.05

1. Hemolysis of 5 % rabbit blood agar read after 18–20 hours at 37°.
2. Hemolysis with the »micromethod« by a 20-hour broth culture.
3. » » » » by a 6-day CO<sub>2</sub> broth culture.
4. » » » titration method by a 6-day CO<sub>2</sub> broth culture.

Table 2.  
Serology.

	abs. with	17 A 30	10 B 14 B	22 A 24 B
Serum 17 A		1600 1600	1600 1600	400 400
	17 A	0 0	0 0	0 0
	30	0 0	0 0	0 0
	10 B	800 800	0 0	0 0
	14 B	800 800	0 0	0 0
	22 A	1600 1600	800 400	0 0
Serum 30	24 B	1600 1600	800 800	0 0
		1600 1600	1600 1600	800 800
	17 A	0 0	0 0	0 0
	30	0 0	0 0	0 0
	10 B	400 800	0 0	0 0
	14 B	400 400	0 0	0 0
Serum 10 B	22 A	800 800	400 400	0 0
	24 B	1600 800	800 800	0 0
		400 400	800 800	800 800
	17 A	0 0	0 0	0 0
	30	0 0	0 0	0 0
	10 B	0 0	0 0	0 0
Serum 14 B	14 B	0 0	0 0	0 0
	22 A	200 200	200 200	0 0
	24 B	200 200	200 200	0 0
		800 800	1600 1600	1600 1600
	17 A	0 0	0 0	0 0
	30	0 0	0 100	100 100
Serum 22 A	10 B	0 0	0 0	0 0
	14 B	0 0	0 0	0 0
	22 A	400 400	400 400	0 0
	24 B	400 400	400 400	0 0
		100 100	800 800	800 800
	17 A	0 0	0 0	0 0
Antigens	30	0 0	0 0	0 0
	10 B	0 0	0 0	0 0
	14 B	0 0	0 0	0 0
	22 A	0 0	0 0	0 0
	24 B	0 0	0 0	0 0
		a, b, c	a, b	a

(continues).

Table 2 (continued).

	abs. with	17 A	30	10 B	14 B	22 A	24 B
Serum 24 B		400	800	1600	1600	1600	1600
	17 A	0	0	0	0	100	100
	30	0	0	0	100	200	200
	10 B	0	0	0	0	0	0
	14 B	0	0	0	0	0	0
	22 A	0	0	0	0	0	0
	24 B	0	0	0	0	0	0
Antigens		a, b, c		a, b		a	

As shown in Table 1, in no instance did the 20-hour broth culture give hemolysis, whereas the 6-day CO<sub>2</sub> broth culture gave no hemolysis in the case of bulla staphylococci but a distinct hemolysis — even within one hour — in the case of the other staphylococci.

Titration of the hemolysis was carried out with decreasing amounts of centrifuged broth culture in 0.5 cc. of salt solution, with addition of 1 cc. of a 1 % suspension of washed rabbit corpuscles. The mixture was incubated at 37° for 1 hour and then left standing in ice-box till the next day. In this test, too, the bulla staphylococci gave no hemolysis. With the other strains, the lowest hemolysis-producing dose was from 0.003 to 0.2 cc.

In the slide agglutination test the bulla staphylococci reacted with the specific pemphigus serum produced in 1939. But only a small rest of this serum was left and the staphylococcal strain that had been employed for the absorption and was stored in dry state had died. It was necessary, therefore, to undertake some new serological studies in order to find a specific pemphigus serum.

Immune sera were produced with 8 staphylococcal strains, 4 of which were agglutinated by the specific serum from 1939. The remaining 4 strains, which were not agglutinated by this serum, originated from nose and throat cultures from the personnel in which their occurrence was abundant. As agglutination with formalin-killed, living or heat-killed sta-

phylcocci had given indistinct results with overlapping agglutinations, I tried to use trypsin-digested antigens after Allison's method, described by Rudd, White & Ward (10), who employed the method for the preparation of antigens of self-agglutinable streptococci. With this technique I succeeded in obtaining uniform and coarsely granular agglutinations that were easy to read. By cross-absorption and agglutination of the 8 sera produced and corresponding trypsin-digested antigens, the 8 staphylococcal strains could be divided into 3 serological types. All the bulla strains were identical and contained antigens a, b and c; 2 nasal strains contained antigens a and b, and 1 nose and throat strain contained antigen a.

After this, sera produced by immunization of rabbits with trypsin-digested bulla staphylococci and absorbed with staphylococci containing antigens a and b, have been employed for slide agglutination and titration agglutination of all the staphylococcus aureus strains collected, antigen c being the criterion for the serological diagnosis of pemphigus. These strains were further examined for ability to coagulate rabbit citrate plasma, ferment mannitolose, and hemolyze rabbit blood corpuscles.

All the bulla cultures in all the cases here examined showed growth of the specific pemphigus staphylococcus in pure culture. In the nose and throat cultures this organism was often found together with ordinary staphylococci, and here the differentiation of the strains was greatly facilitated by the test for hemolysis on rabbit blood plates, as it was sufficient to agglutinate the colonies that did not produce hemolysis. Among the personnel, pemphigus staphylococci were found in 9 persons, in some of whom this organism was demonstrated in numerous cultures covering more than 6 months.

An illustration of the differentiation between the pemphigus staphylococcus and an ordinary staphylococcus is given in Table 4.

In these investigations a few staphylococcal strains have been found that did not hemolyze rabbit blood and were not

Table 3.  
Outcome of Examinations in Two Epidemics of Pemphigus.

Communications in Two Epidemics of Pemphigus.											
		No. examined	1939				No. examined	1941			
			Staph.aureus		Pemphigus			Staph.aureus		Pemphigus	
			No.	%	No.	%		No.	%	No.	%
Patients	Bulla	14	14	100	14	100	26	26	100	26	100
	Nose	26	24	92	17	65	39	41	105	21	51
	Throat	26	20	77	15	57	28	25	89	15	51
Mothers	Bulla	1	1		1		2	1		1	
	Nose	19	14	74	4	21	29	32	110	7	21
	Throat	19	5	26	2	11	29	13	45	1	3.5
Personnel	Bulla						1	1		1	
	Nose	33	5	15	0	0	355	175	49	44	12
	Throat	33	6	18	0	0	359	103	29	8	2

Table 4.  
Studies on the Behaviour of a Pemphigus Staphylococcus and an Ordinary Staphylococcus Aureus as to Plasma Coagulation, Mannitose Fermentation, Hemolysis on 5 % Rabbit Blood Plate and Agglutination with Specific Pemphigus Serum.

		Pl.	Mt.	Hem.	Slide-agglutina.	50	100	200	400	800	1600
Bulla staph.	17 A	+	+	0	+++	3	3	3	3	3	2
Ord. "	10 B	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0

agglutinated by the specific pemphigus serum. Whether or not these strains are serologically related to the pemphigus staphylococci has not yet been settled conclusively. There may indeed be different serological types within the group of the pemphigus staphylococci. In order to be able to form some idea about this question, studies were carried out on cultures from patients admitted to different hospitals with pemphigus and impetigo bullosa.

Some cultures were received from Haderslev in 1939, and these strains have now been examined thoroughly. The only two bulla strains from this material did not hemolyze rabbit

blood and were agglutinated by pemphigus serum, though only at a low titer. In the personnel of this hospital there was a nurse who was suspected of being a carrier because numerous nose and throat swabs from her had yielded growth of staph. aureus in pure culture. These strains did not hemolyze rabbit blood, but they were not agglutinated by pemphigus serum.

From Marselisborg Hospital cultures were received from two patients with pemphigus; they yielded growth of the ordinary staphylococcus in pure culture.

From Rudolph Bergh's Hospital cultures were received from 8 patients; 5 of these yielded pemphigus staphylococci, 3 ordinary staphylococci of the aureus type.

The slightly divergent results may be due in part to the circumstance that the cultures were not all made from a uniform patient material, and partly of inexpedient procedure in swabbing.

From the Lying-in Department B of the Rigshospital, swabs were received from 3 patients, 1 nurse and 1 midwife with bullæ on her fingers; they all yielded pemphigus staphylococci. Cultures from 1 nurse with an abscess on her chin showed ordinary staphylococci. As the first-mentioned cultures showed the same type of staphylococcus as the one that had produced the epidemics in Sønderborg, and as pemphigus occurred rather often in this department, nose and throat swabs were taken from the entire personnel, and among the 121 functionaries 8 were found to harbor in their nose and throat the specific pemphigus staphylococcus.

### *Summary.*

The purpose of the present studies has been to investigate the possibility of defining the characteristics of pemphigus staphylococci within the staph. aureus group, and possibly in this way reveal the presence of carriers among the personnel in an infected milieu.



It has been demonstrated that it is a quite specific type of staph. aureus that has produced the epidemics in the Sønderborg Hospital and in the Lying-in Dep. B. of the Rigshospital. This staphylococcus can be demonstrated by agglutination as well as by complement fixation with sera obtained by absorption of a bulla serum with staphylococci containing certain definite antigens. This demonstration is carried out easily and rapidly by the slide agglutination test.

All the bulla staphylococci here examined have been unable to produce hemolysis on rabbit blood plates, whereas nearly all other strains of staph. aureus are more or less capable of this hemolysis.

By employment of trypsin-digested staphylococcal antigens it has been possible to divide the examined staphylococcal strains into 3 serological types, and — as was the main purpose of this work — to find such serological properties in the pemphigus staphylococci that these organisms can be differentiated from the usual strains of staphylococci.

As to what antigens are destroyed by the trypsin digestion and their significance within the staphylococcus serology, is a question that requires thorough investigation.

#### LITERATURE.

1. Cowan, S. T.: (1939) J. Path. & Bact. 48, 169.
2. Epstein, S.: (1935) Derm. Zeitschr. 70, 328.
3. Flaum, A.: (1938) Acta Path. et Microb. Scand. Suppl. 35.
4. Hegemann, G.: (1937) Zentralbl. f. Bakt. I Orig. 140, 108.
5. Julianelle, L. A.: (1922) J. inf. Dis. 31, 256.
6. Kristensen, M.: (1930) Acta Path. et Microb. Scand. 7, 87.
7. Lewandowsky, F.: (1909) Archiv f. Derm. & Syphilis 94, 163.
8. Noeggerath, C. T.: (1908) Charité-Annalen 32, 93.
9. Parker, J. T., Hopkins, J. G. & Gunther, A.: (1926) Proc. Soc. exper. Biol. & Med. 23, 344.
10. Rudd, G. V., White, Colin & Ward, H. K.: (1939) Australian J. exper. Biol. & med. Sc. 17, 25.
11. Scottmüller, H.: (1923) Leitfaden für die klinisch-bakteriologischen Kulturmethode. Urban & Schwarzenberg, Berlin.
12. Seedorff, J.: (1924) Staphylococci. Disp. Kbhvn.

## DEMONSTRATION OF ANTIGENIC RELATIONSHIP BETWEEN MICROCOCCUS CATARRHALIS AND GONOCOCCI

By Alice Reyn.

(Received for publication May 14th 1942).

Recently Bang & Krag (1) have reported some studies on the gono-reaction in medical patients, in which, among other things, they found a *pronounced correlation between chronic bronchitis and positive gono-reaction*. Among the men who gave a positive gono-reaction and who was known probably to have suffered from gonorrhea, as well, 22 % were suffering from chronic bronchitis, whereas the corresponding figure for men with a negative gono-reaction was 7 %. Something similar applied to the female patients. These numerical proportions were treated statistically and found to be considerably significant. One of the explanations of this finding was that the chronic bronchitis activated or maintained the positive gono-reaction that originated from a previous gonorrheal infection — in other words, that it involved a so-called »*anamnesic seroreaction*«. The occurrence of anamnestic seroreactions has been discussed a good deal, in particular previously, with a view to the serological diagnosis of typhoid fever and paratyphoid by means of the Widal reaction.

Several authors claim to have demonstrated an anamnestic seroreaction on immunization with heterologous bacteria — Dreyer & Walker (2), 1909; Conradi & Bieling (3), 1916; Tsukakara (4), 1921

— while others, (*c. g.*, Rosher (5), 1924) have merely found the titer increased when the immunization was carried out with bacteria closely related to the bacteria employed at the first immunization. In 1919 Bieling (6) found anamnestic seroreaction on injection of typhoid bacilli into rabbits that had been immunized previously with dysentery bacilli (Shiga-Kruse or Flexner Y). Recently Kauffmann (7) has demonstrated an antigenic relationship between 5 types of the Flexner dysentery group and several *Salmonella* bacteria, including *S. typhi*. This does not play any practical role, however, and it appears only in work with very potent *Salmonella* O sera.

Kauffmann (8) has further showed that many cultures of colon bacilli contain *Salmonella* antigens, partly Vi and H antigens, partly H antigens or O antigens. Kauffmann & Langvad-Nielsen (9) further found that as a rule there was no antigenic relationship between pneumococci and *Salmonella* species; an exception to this rule is found in pneumococci Type 35, the sera of which agglutinate *S. kirkee*.

It is possible, therefore, that the bacteria designated as »heterologous« by earlier authors and claimed to have produced anamnestic seroreactions in animal experiments actually have all had some antigenic quota in common with the bacteria employed for the first immunization.

An altogether different type of anamnestic seroreaction, it has been claimed, may arise on immunization with different proteins and split products of proteins, etc., but it would take us too far here to enter into these conditions.

It is rather obvious to imagine the connection between bronchitis and a positive gono-reaction as attributable to antigenic relationship between *Micrococcus catarrhalis* and gonococci, as *M. cat.* is assumed to play a role in bronchitis.

The pathogenicity of *M. cat.* has been somewhat disputed, however. Some authors (*c. g.*, Arkwright (10), 1907) have found *M. cat.* in normal secretion from the nose and throat, while others (D. & R. Thomson (11), 1932) did not find »true« *M. cat.* in normal nasal secretion or saliva, and hence the latter authors concluded that *M. cat.* is of decisive significance to the production of ordinary colds. This further opens the possibility of a connection with bronchitis, which often accompanies or follows a cold. *M. cat.* has further been claimed to be able to produce: meningitis, conjunctivitis.

sepsis, endocarditis, pneumonia, arthritis, and urethritis. Unfortunately, the reported cases have not all been equally well examined bacteriologically.

As to antigenic relationship between *M. cat.* and gonococci, the findings reported so far have been somewhat conflicting. In 1908 Bruchner (12) performed agglutination tests on *M. cat.* with meningococcal and gonococcal sera and found that *M. cat.* did not react with these sera; the lowest dilution of serum employed was 1:100. In 1909 Elser & Huntoon (13) were able to distinguish between gonococci and *M. cat.* by agglutination only after absorption of the sera; they found that 6 gonococcal strains were agglutinated both by gonococcal serum and catarrhalis serum — and even by normal rabbit serum. Overlapping reactions between *M. cat.* and gonococci were reported also by Wollstein (14), 1907; Verderame (15), 1912; and Kolmer & Brown (16), 1914. On the other hand, Warren (17) in 1921 found no reaction between catarrhalis strains and gonococcal sera in simple agglutination tests.

In 1929, Oliver (18) demonstrated, among other things, a positive gono-reaction in sera from rabbits that had been immunized with *M. cat.* In 1933, Jessen (19) arrived at the same result but none of the examined catarrhalis strains reacted with sera from rabbits which had been immunized with gonococci.

Both Oliver and Jessen arrived at the conclusion that these overlapping reactions imply a risk of unspecific gono-reaction in man, but Jessen thinks that further investigation into these conditions is required.

Jessen examined a number of sera from adults with a pentavalent catarrhalis antigen, and found 30—40 % of the subjects to give a positive complement fixation reaction. Sera from very young children, 0—4 years old, gave a positive reaction but extremely seldom. Kolmer, Trist & Yagle (20) in 1919 found no normal adult subjects giving a positive complement fixation reaction with *M. cat.* whereas 38 % of influenza patients examined in this way gave a positive reaction.

In 1934 Boor & Miller (21) produced precipitating sera against a protein and a carbohydrate contained, in meningococci, gonococci and *M. cat.* They found that the protein from *M. cat.* and from the meningococci reacted with all three antisera while the protein from gonococci reacted only with gonococcal and meningococcal sera. There was no fixation between the carbohydrate from *M. cat.* and antisera against the carbohydrate substance from meningococci and gonococci. Trypsin digestion abolished the overlapping protein reactions between non-capsulate pneumococci and meningococci. In

the *Neisseria*, on the other hand, the common antigen was preserved in spite of tryptic digestion.

Göhring (1940) found positive gono-reaction in rat sera after intraperitoneal immunization, among others, with M. cat., and positive complement fixation reaction in patients suffering from gonorrhea when M. cat. was used as antigen.

Recently, on the basis of the studies reported by Jessen and other investigators, Krag (23) tried out 10 catarrhalis strains which had been isolated in the Vaccine Department of the State Serum Institute. With these strains he performed complement fixation tests analogous to the gono-reaction as given by Kristensen (24). The 10 strains differed greatly in their reaction: one strain, M. cat. 465 had a particularly high reaction percentage; two strains had a somewhat lower reaction percentage; and the remaining strains showed practically no reaction. All these strains were tested against the same sera, which were picked out at random among the sera received by the Serodiagnostic Department.

M. cat. 465 was then tried out in complement fixation tests with human sera, some of which gave a positive gono-reaction while others gave a negative reaction. The reaction percentage of M. cat. 465 was somewhat higher in the group of tests carried out with gono-positive sera than in the other, but the difference was not statistically significant. There was no definite correlation between the strengths of the gono-reaction and the catarrhalis reaction, respectively.

While these experiments thus gave no definite information, they were still suggestive of an antigenic relationship between gonococci and M. cat. — at any rate, some catarrhalis strains.

If by immunization with M. cat. it proved possible to produce a positive gono-reaction in rabbits which previously had been immunized with gonococci, it would correspond to the phenomenon: that patients who once had had gonorrhea were later exposed to the effect of catarrhalis antigen — for instance, in the course of an attack of bronchitis — and in this way had their capacity for gono-reaction activated.

### *Writer's Experiments.*

A total of 18 rabbits were immunized with various bacterial strains; 9 of these rabbits had been immunized previously with gonococci while 9 served as controls. In their previous

gono-reaction, while the »gonococcal rabbits« constantly gave a positive gono-reaction. Thus the experiments were not carried out with »gono-negative« rabbits but with rabbits giving constantly a positive gono-reaction, for these did not finally give any negative gono-reaction, although they had not been immunized for about 6 months. In the first two months after the immunization, the strength of the gono-reaction fell off about 7 degrees\*), but after this it remained constant for 2—3 months.

The following bacterial strains were employed for the present immunization: one gonococcal strain (No. 11423), one *M. catarrhalis* strain (No. 465), one hemolytic streptococcus Group A strain (»Aronson Schnitzer«), and one paratyphoid B strain (No. 16174/41). Thus the strains here employed were gonococci and *M. cat.*, between which some antigenic relationship might be expected, and two bacterial species which probably had no antigenic relationship — neither mutually nor with gonococci and *M. cat.*

*Technique:* The bacterial suspensions employed consisted of formalin-killed cultures with a density of about 1000 million per cc. The first injection of 1 cc. was given intravenously, the second and following injections all of 2 cc., likewise given intravenously. The first injection was given on January 24, 1942; the following injections were given twice a week, the last one on February 28. The antibody content of the sera is measured by complement fixation, with the same technique as for the gono-reaction.

All 18 rabbits were examined for all 4 reactions: gono-reaction, catarrhalis reaction, »Aronson« reaction and paratyphoid B reaction. In every experiment, the reaction was carried out with all 18 sera.

Prior to the present immunization all the rabbits gave negative catarrhalis, Aronson and paratyphoid reactions; the 9 controls gave also a negative gono-reaction, whereas the

---

\*) The degree of the strength is a logarithmic expression for the titer of the test (24).



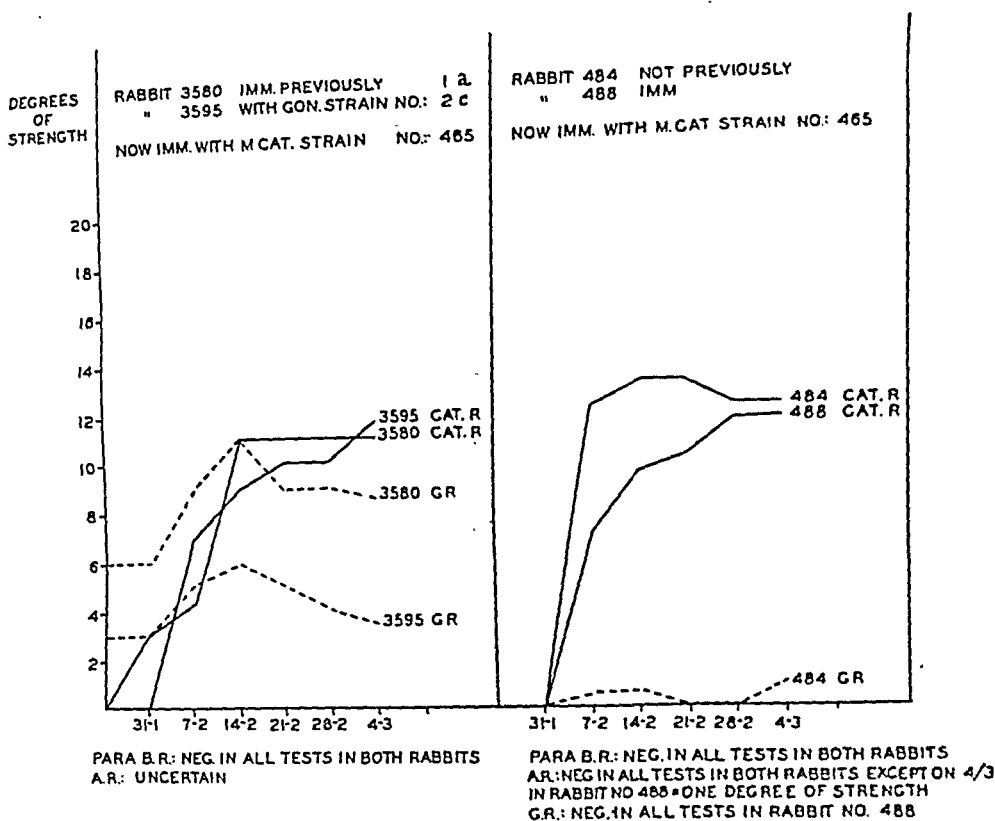


FIG. 2

- G. R. = Gono-reaction  
Cat. R. = Catarrhalis reaction  
A. R. = Aronson reaction  
Para B. R. = Paratyphoid B reaction

with gonococcal serology. Probably this positive gono-reaction is due to bacteria related to the gonococci. I have looked for those bacteria, unsuccessfully. In a rabbit with a «spontaneous» positive gono-reaction (about 6 degrees) 4 samples of blood were taken at intervals of about 1 month, and all gave a negative catarrhalis reaction.

On the other hand, a positive catarrhalis reaction was never observed in any non-immunized rabbit.

Figure 1 shows the course of the gono-reaction and the



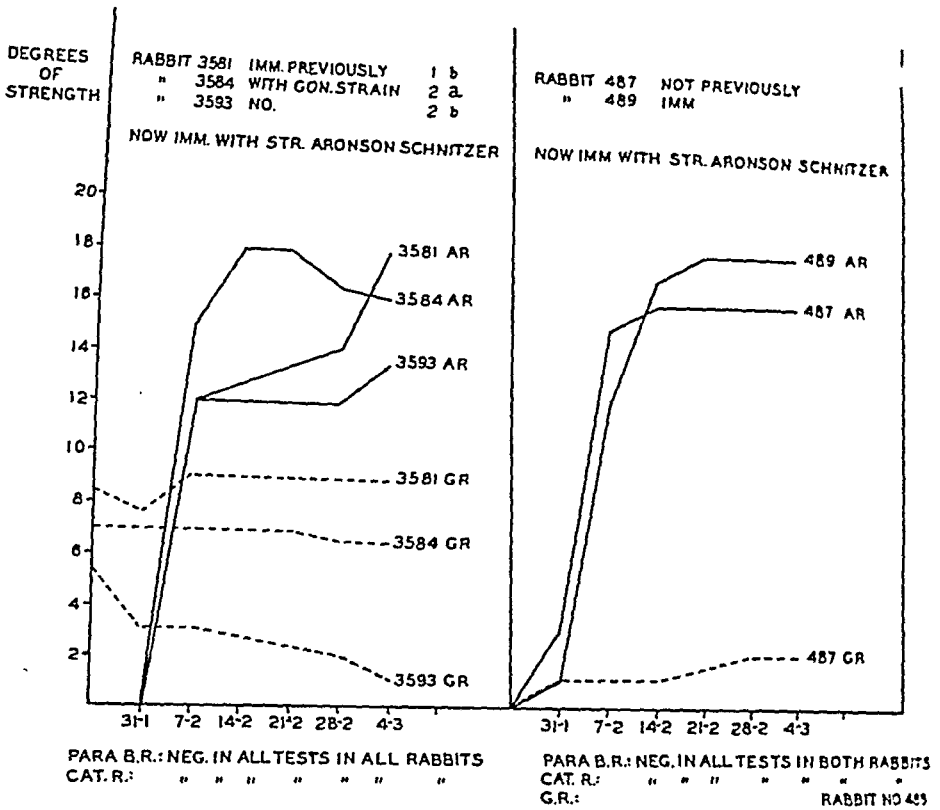


FIG. 3

G. R. = Gono-reaction  
 Cat. R. = Catarrhalis reaction  
 A. R. = Aronson reaction  
 Para B. R. = Paratyphoid B reaction

*catarrhalis* reaction in 4 rabbits, 2 »gonococcal rabbits« and 2 controls. Now the animals are immunized with gonococci. All the rabbits have a uniform marked rise in titer in the gono-reaction, and the 2 first rabbits (3574 and 705) give, in addition, a positive catarrhalis reaction of about 3 degrees. One control rabbit gives ultimately a suggestion of catarrhalis reaction, whereas the other keeps showing a negative catarrhalis reaction. The paratyphoid B reaction is negative in all the animals, whereas the Aronson reaction is somewhat un-

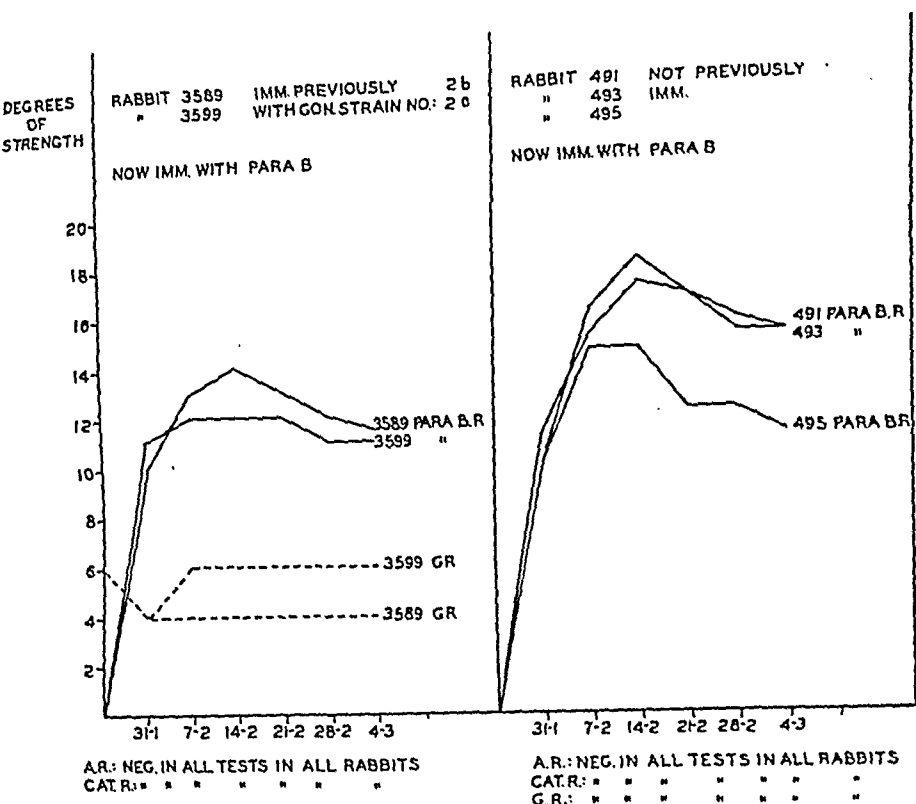


FIG. 4

G. R. = Gono-reaction  
 Cat. R. = Catarrhalis reaction  
 A. R. = Aronson reaction  
 Para B. R. = Paratyphoid B reaction

certain in both of the previously immunized rabbits\*), but negative in both controls.

Also Figure 2 shows the course of the gono-reaction and catarrhalis reaction in 4 rabbits, 2 previously immunized and 2 controls. These rabbits are now immunized with M. cat. 465. All 4 rabbits show a uniform marked rise in titer in the catarrhalis reaction and, in addition, the 2 gonococcal rab-

\*) This fact will subsequently be investigated further.

*bits* show an increase in the gono-reaction, amounting in one animal to 5 degrees (titer 1/108—1/674), in the other to 3 degrees (titer 1/36—1/108). Of the controls, one keeps giving a negative gono-reaction, while the other shows a suggestion of a positive gono-reaction, but no more than is often seen in rabbits that have never been immunized. These rabbits are living yet and will later be hyperimmunized with M. cal. 465. It looks a little strange that they did not acquire a positive gono-reaction — like the animals examined by Oliver and by Jessen — but perhaps they should have been immunized for a longer period in order to induce the reaction. Or, it may be that the positive gono-reactions obtained by Oliver and by Jessen in »catarrhalis rabbits« were »spontaneous« reactions which had nothing to do with the immunization.

The paratyphoid B reaction is negative in all the rabbits; and the Aronson reaction is here about the same as in Table 1, *i. e.*, practically negative in the two controls, and somewhat uncertain in the previously immunized animals.

Figure 3 shows the course of the gono-reaction and Aronson reaction in 5 rabbits: 5 »gonococcal rabbits« and 2 controls. The rabbits are immunized with the hemolytic streptococcus strain »Aronson Schnitzer«. There is a *uniform and marked rise in the titer in the Aronson reaction in all 5 animals*, whereas the gono-reaction is *constant or falling off* in the three previously immunized animals, and negative in one control. The other control shows now a weak positive gono-reaction to which no significance may be attached.

The paratyphoid B and catarrhalis reactions are negative in all the animals.

Figure 4 gives a corresponding survey of the reactions in 5 rabbits immunized with paratyphoid B bacilli: 2 »gonococcal rabbits« and 3 controls. The *paratyphoid B reaction shows a distinct rise in titer in all five animals*, whereas the gono-reaction *remains constant in the previously immunized rabbits* and practically negative in the three controls.

The catarrhalis reaction and the Aronson reaction are negative in all the rabbits.

### *Absorption Experiments.*

In connection with these immunizing experiments, some absorption experiments were performed with the following technique:

The antigen employed for the absorption was formalin-killed culture, stored in buffer saline (pH 7.38) with an addition of 0.5 % formalin; density about 20000 million per cc. Before the absorption the culture was centrifuged for 30 minutes — rate about 3000 revolutions per minute — the supernatant fluid was carefully pipetted off, and undiluted serum was poured on the sediment. Then the culture was suspended in the serum, and the mixture was left standing overnight at  $+4^{\circ}$ . Next morning the suspension was centrifuged and the absorbed serum pipetted off. With this procedure there is practically no dilution of the serum in the absorption process.

The present experiment comprises 17 sera from patients with unquestionable gonorrheal infection. The sera are picked out so that they all give a positive gono-reaction (degrees 2—11). Of these patients 15 gave also positive catarrhalis reaction (degrees 3—7) while 2 gave a negative catarrhalis reaction.

*M. cat. antigen* (No. 465) was able by absorption of human gono-positive sera to remove a part of the gono-reaction. By increasing the absorbing dose it was possible to remove a greater part of the gono-reaction as shown in Table 1. The amount of antibody absorbed was independent of the strength of the gono-reaction and catarrhalis reaction. The latter was completely removed by the smallest absorbent dose employed.

On the other hand, a mixed *gonococcal antigen* (consisting of 6 serologically non-determined strains picked out at random), was unable to remove any part of the catarrhalis reaction from the same sera, which all were catarrhalis-positive, although the gono-reaction was completely removed. For control, corresponding tests were made with a *paratyphoid B antigen* and 5 sera that were both gono-positive and catar-

Table 1.

*Absorption of Human Gono-positive Sera with M. Cat. Gonococci and Paratyphoid B Bacilli.*

Absorption antigen	Dose per cc. of serum	No. of sera	Average fall in degrees of strength	
			Gonoreaction	Catarrhalis reaction
M. cat.	40,000 million	16	ca. $\frac{1}{2}$	Compleat absorption
„	80,000 „	17	„ 1	„ „
„	160,000 „	5	„ 2	„ „
Gonococcus	40,000 million	15	Complete absorption	0
„	80,000 „	15	„	0
Paratyphoid B	40,000 million	5	0	0
„ „	80,000 „	5	0	0

rhalis-positive, but absorption with this antigen caused no change in the two reactions. These sera gave a negative paratyphoid B reaction both before and after the absorption.

None of Jessen's 29 catarrhalis strains reacted with sera produced by immunization with gonococci. In contrast hereto, I found that 5 out of 8 rabbits that were immunized with different gonococcal strains reacted with my catarrhalis antigen with a strength of 1—6 degrees. Prior to their immunization, these rabbits gave a negative catarrhalis reaction.

These conflicting results are perhaps to be explained by the fact that the M. cat. strain 465 was a strongly reacting strain and, therefore, particularly suitable for such experimental studies. On the whole, I think, the different results obtained by previous investigators may be explained by the circumstance that the catarrhalis strains serologically differ more than is generally reckoned with. Jessen says (*l.c.*, p. 114): »Serologically the group appears to be fairly uniform. Only Strain 117 differs from the other catarrhalis strains in simple complement fixation, as it reacts with 2 Group 1 A sera (chromogenic cocci)«. There are 7 additional strains, however, that react, although weakly, with a serum produced



## REFERENCES

1. *Bang, O. and Krag, P.*: Gonoreaktioner hos medicinske Patienter. Ugesk. f. læger, 15: 406—412, 1912.
2. *Dreyer G. & Walker, E. W. A.*: Observations on the production of immune substances. J. Path. & Bact., 14: 28, 1909.
3. *Conradi, A. & Bieling, R.*: Über Fehlerquellen der Gruber-Widalschen Reaktion. Deutsche Med. Wchnschr., 1916, II: pp. 1280.
4. *Tsukahara, I.*: Verlauf der Agglutininbildung bei Infektion normaler und immunisierter Tiere. Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap., 32: 410, 1921.
5. *Rosher, A. B.*: On a steady agglutination titer with reference to the diagnosis of enteric in inoculated subjects. Lancet, 1924, II: pp. 110.
6. *Bieling, R.*: Untersuchungen über die veränderte Agglutininbildung mit Ruhrbacillen vorbehandelten Kaninchen. Ztschr. f. Immunitätsforsch. i exper. Therap., 28: 246—279, 1919 orig.
7. *Kauffmann, F.*: Zur Serologie der Dysenteriegruppe. Acta path. et microbiol. Scandinav. 19: 53—57, 1912.
8. — Über das Vorkommen von Salmonella-Antigenen in Coli-Kulturen. Acta path. et microbiol. Scandinav. 18: 225—246, 1911.
9. *Kauffmann, F. & Langvad-Nielsen, A.*: Über Antigenbeziehungen zwischen Pneumokokken und Salmonella-Bakterien. Acta path. et microbiol. Scandinav. 19: 108—111, 1912.
10. *Arkwright, J. A.*: On the occurrence of the M. cat. in normal and cat. noses and its differentiation from other gram-negativ cocci. J. Hyg. 7: 145, 1907.
11. *Thomson, D. & R.*: Common cold with special reference to part played by micr. catarrhalis. Ann. Pickett-Thomson Research Lab. 8: 1—699, 1932.
12. *Bruchner, J.*: Sur le micrococcus catarrhalis de Pfeiffer et ses relations avec le Groupe Gonocoque-Meningocoque. Compt. rend. Soc. de biol. 64: 619, 1908.
13. *Elser, W. J. & F. M. Huntoon.*: Studies on meningitis. J. Med. Research, 20: 371, 1909.
14. *Wollstein, M.*: Biological relationships of diplococcus intracellularis and gonococcus. J. Exper. Med., 9: 588, 1907.
15. *Verderame, Ph.*: Zur Differenzierung gramnegativen Diplokokken mit Hilfe der Agglutination — und Komplementbindungsprobe. Zentralbl. f. Bakt., 67: 307, 1912.





FROM THE SAUDA HOSPITAL, SAUDA, NORWAY.  
(CHIEF SURGEON: DR. JUL. RIDDERVOLD).

---

## BACTERIOLOGICAL INVESTIGATIONS ON PNEUMONIA AND PNEUMOCOCCUS CARRIERS IN SAUDA, AN ISOLATED INDUSTRIAL COMMUNITY IN NORWAY

By *Jul. Riddervold & Knut Halvorsen.*

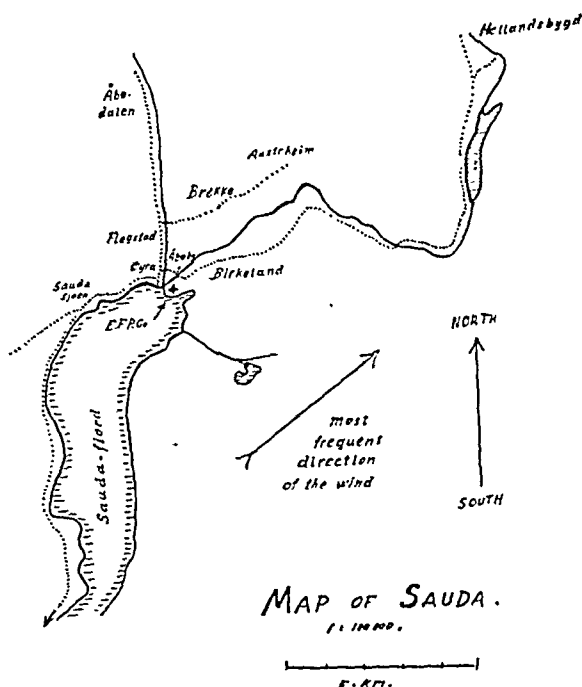
(Received for publication May 22nd 1942).

### *Introduction.*

*Sauda* is an isolated village in Western Norway, situated at the innermost end of a deep fjord and surrounded by high mountains. The only possible communication with the neighbouring communities is along the fjord, either by boat or motorcar, and to reach the nearest habitations will take about one hour. The climate is rainy, the average precipitation being 2000 mm a year, with sudden changes in the weather. Such a climate with sudden weather changes may be supposed to predispose to colds and acute catarrhs in the respiratory tract.

Before 1915 *Sauda* had about 1500 inhabitants and these almost exclusively lived from agriculture. In 1915 the erection of a larger factory was begun, which started in 1923. Here ferro-alloys (especially ferromanganese) are produced by electric melting processes. The population of *Sauda* has ever since gradually increased up to about 4500 living there to-day. On the whole the hygienic state is a very good one.

During the same year the factory was started, an epidemic of croupous pneumonia broke out. How many were affected



then, one does not know, but 5 persons died. Two of these deaths, however, occurred in a family living at Hustveit, 9 km (in a straight line) from the factory. This fact in itself is not so remarkable. Both from Norway and other countries numerous examples are known of pneumonia epidemics of shorter durations. What is striking in this case, is that the high morbidity and mortality have (with certain fluctuations) lasted on ever since through the past 15 years. How large the figures for the mortality have been during this period compared with other places will be gathered from *table 1*.

It is thus obvious that Sauda during this period has had an exceptionally high mortality of pneumonia. From investigations carried out by Dagfinn Elstad is to be gathered that the morbidity too, during the said period, was extraordinarily high.

Already at an early date one looked for an explanation of these facts. Some thought that the cause might be some

Table 1.

Mortality of pneumonia (all kinds) per 100 000 inhabitants.

Sauda 1924-37	a) Oslo 1924-36	a) Norway 1924-36	b) U.S.A. 1933-37	c) Pittsburgh 1929-31	c) Long Beach 1929-31
326	106	82	82	217	42
NB. Croupous pneumonia only					

a) From Norwegian medical statistics.

b) From Public Health Reports (United States Public Health Service).

c) J. Amer. Med. Assoc. 1937:109:1910. Pittsburgh has the highest and Long Beach the lowest mortality of pneumonia among the larger cities in the U. S. A.

particularly virulent pneumococci, while others, especially the population of Sauda, blamed the smoke from the factory, which they believed to contain noxious substances.

In 1929 Axel Holst (1) gave a report of the state of affairs, and in the following year Jul. Riddervold rendered a statistical and clinical account of it in his article: »Pneumonia crouposa epidemica» (2).

Some bacteriological investigations were carried out by P. M. Holst (3) who found type 3 in two patients out of three, though subsequent examinations the year after did not show any preponderance of this type, but a distribution corresponding to that found elsewhere. In spite of that, the assumption that the high mortality was related to particularly pathogenous pneumococci, was not abandoned.

In 1930 P. W. K. Böckman made chemical analyses of the smoke and dust in the air. He found relatively little manganese but rather large amounts of silica. If there was any relation between the smoke and the pneumonias at all, he thought the silicic acid might probably be of importance. Later statistical investigations by Dagfinn Elstad (4, 5) gave the interesting result that there was a definite relation between the production of manganese alloys and the morbidity and mortality of pneumonia in Sauda. In periods with high output the morbidity and mortality were high too, and he concludes that: »It seems reasonable to me to suppose that the high morbidity

and mortality of pneumonia in Sauda is due to this exposure to manganese through the smoke.<sup>6</sup>

In the light of the investigations quoted we thought it might be of great interest to explore the *bacteriological conditions* of the Sauda pneumonias. We were especially interested to inquire whether there was in Sauda a preponderance of particularly virulent types of pneumococci compared with the results of other known investigations. This was then thought to form the basis of a subsequent prophylactic vaccination and serum treatment. This plan was worked out before the new chemical therapeutics became known. The original plan was to examine patients and their contacts only, but this was later extended to an examination of healthy individuals on a larger scale.

*Previous investigations.* Already Pasteur (6,7) demonstrated pneumococci in the throats of healthy people. Later quite a deal has been written about this. The frequency with which pneumococci were to be found has been reported very differently, and it may certainly vary considerably from place to place and from time to time, and naturally also according to the method of examination employed. The majority of the investigations performed seems to indicate that one might expect to find pneumococci in from 40 to 60 % of all the healthy individuals examined. In Norway only a few such examinations are made before by Axel Ström (8,9) who out of 50 persons examined found 60 % carriers. Besides of this Jon Björnsson is engaged in some investigations at present in Oslo. In other countries, especially the U.S. and Germany, there exist many investigations.

On the typing of pneumococci in pneumonia patients here in Norway a short communication by K. Skajaa (10) appeared in 1921 and a more detailed report by Thjötta and Hanneborg (11,12) in 1924. These authors make use of the older distinction of four groups. Of more recent publications there is one from Oslo 1938 by Erik Waaler and Knut Halvorsen (13).

*Technique.* For sputum examination the following technique was used by us:

- 1) Direct microscopic examination after staining with Gram's staining fluid.
- 2) Inoculation on blood-agar with isolation of single colonies.
- 3) Injection into a mouse (intraperitoneally).
- 4) Attempt to determine the types directly by means of the Neufeld's method.

- 5) If the mouse fell sick or died, an autopsy was performed and the types determined in the peritoneal exudation.

When examining healthy persons we obtained samples from the throat (tonsils) by means of steril swabs and treated these as follows:

- 1) Inoculation on blood-agar with isolation of single colonies.
- 2) The swabs were then washed in about 1 cc broth and this injected into mice.
- 3) If the mouse fell ill or died, an autopsy was performed and a determination of the type attempted in the peritoneal exudation.
- 4) All the mice alive after five days were killed and blood cultures made.

In quite a few cases we were, by using this method, able to isolate and type strains of low virulence. The virulence of these strains increased in the usual way by animal passage. Quite avirulent strains we were unable to isolate in this manner. As a rule we have not tried to find more than one type in the same individual but contended ourselves with the strain showing the greatest virulence in the mice.

We used serum from Lederle Laboratories, types 1—32, with the exception of types 26 and 30.

### *Personal investigations.*

Our investigations, quite naturally, fell into three groups, viz. pneumonia patients, contacts and healthy subjects. We find it reasonable to discuss the pneumonia cases first.

#### *A. P n e u m o n i a c a s e s.*

We examined 46 cases of lobar pneumonia in the period from May 1938 till October 1939 (*table 2*). In 13 of these cases we found pneumococci of type 1, in 4 cases type 2, and in 5 cases type 3. Taking into consideration how little our material is, one must confess that our figures are in rather good agreement with the larger American statistics of recent years. Compared with older Norwegian investigations, which differ greatly from one another, they occupy an intermediate position. One case was possibly caused by pneumococci; these could not be demonstrated though, the sample

Table 2.

Pneumococcus infections. Distribution of types. (in parenthesis the number of deaths).

	Lobar pneumonias			Broncho-pneumonias	Influenza and quite atypical pneumonias	Lobar pneumonias in Oslo 1937-38*)
	Group I No serum No sulfapyridine	Group II Sulfapyridine	Total			
Type 1	9 (4)	4	13	2		7 (2)
2	2 (1)	2	4	1		1
3		5 (1)	5	1	2	21 (9)
4	1		1			6 (1)
5						2 (1)
6		3	3			3 (1)
7		4	4		1	11 (2)
8						3 (1)
9		1	1			1
10						4 (1)
11	1	1	2			—
12						5 (2)
13				1	2	1
14	2 (1)	2	4	1		2
15					2	—
16		1	1			1
17		1	1	1		3 (1)
18				1		8 (4)
19	1	1	2	1	1	3 (3)
20						1
21						—
22						—
23	2		2			1
24						—
25						1
27						1
28						—
29						1
31	1		1	1	1	1 (1)
32						—
Unknown	1	1	2			1
Total	20 (6)	26 (1)	46	10	9	88 (29)

\*) Erik Waaler & Knut Halvorsen (13).

first being taken after 1 day's treatment with Dagenan (sul-fanilyl-aminopyridine, May & Baker 693). In another case we were — in spite of painstaking attempts — unable to demonstrate pneumococci, only a predominance of green streptococci. Anyway, it does not seem probable that these were the cause of the pneumonia.

Of the 46 patients 20 were treated neither with serum nor with chemical therapeutics. The other 26 cases were treated with Dagenan, in one case in combination with serum. Six out of our seven lethal cases were untreated ones. In the first group 4 of 9 patients with type 1 died, while in the second group none with this type died. As to type 3, there was no case among the untreated patients, but five among the treated with only one death. This, besides, was an elderly man with a severe diabetes (vide infra case 1). It is difficult to compare the two groups, as the distribution of the types was not the same, but we think that one could have expected a much higher mortality in the group of the treated cases. We have the impression that the therapy with Dagenan is very satisfactory. Of serious complications we only observed once a hemorrhagic diathesis.

It might be of interest to deal somewhat more closely with some of the pneumonia cases:

1) Man, aged 64, with a severe diabetes which he had been treating poorly. He caught a croupous pneumonia with pneumococci of type 6 in his sputum. In the course of a week he received 20 tablets (10 grams) of Dagenan and insulin. He got very much better, but two days later he fell suddenly ill again. This was another pneumonia. Treatment with Dagenan was tried anew, but death occurred after a few hours. The blood picture immediately before death was normal. The interesting feature of this case is the result of the bacteriological examination during the second pneumonia. Now type 3 was found, while type 6, which had been found previously no longer could be demonstrated. The patient was probably infected with type 3 in the hospital. The source of the disease is not difficult to point out, as several of the

nurses and one of the doctors at that time were type 3 carriers.

2) A young woman was examined monthly for 6 months, each time pneumococci of type 3 being found. Suddenly she developed a very serious croupous pneumonia. In the sputum type 3 was found almost in pure culture. The patient received 300 000 units of serum and in all 90 tablets of Dagenan. Later type 3 likewise was found at every examination for a period of half a year. — We regard this case as an example of autoinfection.

3) The next case is that of a man, aged 59, who had had pneumonia twice before. He fell ill with high fever. During the first days there were no physical signs of pneumonia, and the illness was diagnosed as a case of influenza. In the sputum a nearly pure culture of type 3 was found. On the fifth day a decided exacerbation of the patient's condition occurred, and a croupous pneumonia in the right lung was then demonstrated. The patient was at once given Dagenan, in all 73 tablets in the course of 6 days. The crisis first appeared on the fifth day of the pneumonia. In the sputum here too was found a nearly pure culture of type 3. — Five months later the patient developed a new serious croupous pneumonia of the same type, but this time situated on the left side. Type 3 was observed in the patient's throat about two months after the first pneumonia; later no further samples were taken though.

The last mentioned case is very interesting and furnishes matter for *discussion*. One observes frequently that individuals who have gone through one pneumonia later in life may catch the same disease anew. Pneumonia, as distinct from many other infectious diseases, does not seem to leave persistent immunity. Before the classification into serological types one thought that a lung, that had been affected by pneumonia, might become less resistant to new infections. In our case it is however the other lung which is affected. After one had learned to distinguish serological types of pneumococci, it seemed however more reasonable to assume that



this lack of immunity only was apparent, and that these individuals, when they got their second or third pneumonia, were affected by new types, and that thus the immunity eventually present only should protect against the types that had caused the previous pneumonias. In our case two serious attacks of pneumonia of the same type were observed in one and the same individual with an interval of five months. The first pneumonia, therefore, does not seem to have produced any immunity of longer duration. The determination of the types in both cases was carried out directly in the sputum with Neufeld's method. There is, therefore, no reason to believe that a type of lesser virulence in mice might have been the cause of any of the two pneumonias. The short duration of the period of immunity observed here does not speak in favour of prophylactic vaccine treatment to have any effect, such as reported from the Rand Mines in South Africa by Maynard (14) and Lister (15), and from American military camps by Cecil & Austin (16) and Cecil & Vaughan (17).

Case 3 and 4 also point to another important question, viz. the importance for the development of pneumonias of the prevailing conditions with respect to the pneumococcus carriers. In cases of croupous pneumonia it has, as you know, been emphasized that in the main it was the infection taking place from the outside, from pneumonia patients and contacts, which was of importance. We know, however, also cases where pneumonococci are found in the throat of the individuals previously. Here we have two cases of croupous pneumonia in which the pathogenic pneumococcus had been demonstrated upon the mucous membranes of the patients months before they fell ill. These two cases speak against Neufeld & Etinger-Tulczynska's (18) assumption that the »carrier conditions« should leave behind any immunity in the individuals in question. Besides these two cases of croupous pneumonia with autoinfection, we observed a case of postoperative bronchopneumonia with type 13, in which we had demonstrated this type in advance. It is, for the rest,

just in cases like these, in which the patients had suffered a state of weakness of one kind or other, that we may expect autoinfection to take place.

A few isolated cases naturally are of no great bearing, and one must be careful not to draw hasty conclusions. It may thus be of importance too that the patients in question have been treated with Dagenan. Whether this preparation has any effect upon the immunological reaction is so far unknown.

Age distribution in our material must be said to be normal (table 3). The average age of the patients was 34 years.

Table 3.

Age groups of patients with croupous pneumonia. Average Age: 34 years. Number of death in parenthesis.

Age	0—15	15—30	30—40	40—50	50—60	More than 60
Patients	11	11	3	5 (2)	9 (2)	6 (3)

One will however notice that all the deaths in our material occurred in patients above 40. Hitherto we had been used to find a high mortality in the age group 15—40 years.

Of the 10 cases of bronchopneumonia observed (most of which were secondary) 4 had been caused by the three first types. There were no deaths. One-half of the patients were treated with Dagenan. We were able to demonstrate pneumococci in all the cases of bronchopneumonia examined, but not in a single case hemolytic streptococci. In a case of postoperative bronchopneumonia, where we a few days previously had found hemolytic streptococci in the throat of the patient, these even disappeared when the pneumonia developed. In the expectoration pneumococci of type 13 were demonstrated.

In table 2 we find also a column headed: Influenza and quite atypical pneumonias. Two of these are cases of pneumonias (type 7 and 15 respectively) in ambulant patients.

These patients had moderate fever or none at all, but expectoration and an increased sedimentation rate, and roentgenologically a distinct infiltration. The rest of the cases were colds or »flues«. We had many similar cases, but we included the cases only in which pneumococci were the predominant microbe.

### B. Contacts.

In 14 of our cases we had the opportunity to examine the patient's family and closer surroundings. Altogether we took 73 samples, but only in 6 of the 14 cases we were able to find the same type of pneumococci in the patient and in one or several of the contacts. Pneumococci of other types, however, were frequently observed. — Each individual was merely examined once, oftenest a few days after the onset of the disease.

By repeated examination at different intervals one would probably have been able to demonstrate infection in still some more cases.

1) In an isolated family, living at some distance from Sauda near the fjord, a middleaged woman dies of croupous pneumonia (type 1). Her sister, who nursed her, immediately afterwards catches a serious pneumonia of the same type. On examining 10 contacts type 1 was found only once, while type 8 was observed four times.

2) A father and his daughter simultaneously catch a severe flue with a nearly pure culture of type 3 in their sputums. In the father this leads to a serious pneumonia of the same type (vide supra case 3). In three contacts examined type 3 could not be detected.

3) A severe pneumonia caused by type 3 develops in a young woman. Type 3 is demonstrated in 4 of 8 contacts. In one of these this type had already been detected 1 month in advance.

4) In all the three brothers and sisters of a little boy with type 14 pneumonia this type could be demonstrated.

On other hand we have many cases where we were unable to demonstrate any infection or transfer by contact:

5) 30 schoolboys were on a holiday trip. They had lived together for a week, but had had no contact with the local population. One of the boys got a pneumonia of type 7, while this type could not be found in any of the others.

6) Even if several cases of pneumonia occur simultaneously in one and the same family, one should be careful in calling it infection, unless one is able to find support for this in the bacteriological examination. — From one family with three simultaneous cases of croupous pneumonia samples from two of the patients were sent us. In one of these type 1 was found while type 6 in the other. In spite of repeated samples being taken it proved impossible to demonstrate more than one type in either of the expectorations.

As will appear from our examinations of healthy persons we found 48 % of these, on examining only once, were pneumococcus carriers. Possibilities of infection, therefore, are present to a considerable extent. To demonstrate this infection in each individual case proved very difficult though, the daily contact of the population being very intense. When we tried to isolate contacts within a definite district or within certain families, where there had been pneumonia, we have for that not been very successful.

We do not doubt, however, that the possibilities of infection are numerous. In consequence we adopted the view that all cases of pneumonia should be isolated satisfactorily.

### C. Healthy subjects.

Our material in this group consists of 2152 samples obtained from 1475 healthy individuals. Where a number of samples were taken, there was an interval of one month or more between two subsequent samples. Pneumococci were found in 1077 samples, that is in 50 % of all the samples taken. If we only reckon the first-time examinations the

Table 4.

Survey of earlier investigations on healthy subjects.

Author	Number of individuals tested	Number of tests	Percentage of pneumococcus carriers	% of all tests				% of all pneumococci found				Remarks
				Type 1	Type 2	Type 3	Group IV	Type 1	Type 2	Type 3	Group IV	
1. Dochez & Avery (19)	113	113	58.4	2.6	7.0	—	48.8	4.5	12.0	—	83.5	Types 1 and 2 found in contacts only. Type 3 difficult to demonstrate
2. Stillman (20)	398	398	43.2	1	1	11.1	30.1	2.2	2.2	23.4	72.2	Types 1 and 2 observed in 8 cases in all, with infection through contact in 6. Besides, 26 cases of "atypical type 2", probably to be included in group IV
3. Rosenau, Felton & Atwater (21)	180	180	47.3	1.1	2.2	5.0	39.0	2.2	4.4	9.9	83.5	No contacts included
4. Powell, Atwater & Felton (22)	93	418	63.6	3.1	4.8	7.6	48.1	4.3	6.7	10.7	78.3	Each individual tested 4—6 times at intervals of about 1 month
5. Gundel & Linden (23)	99	1113	55.9	1.7	2.5	9.1	42.5	3.9	4.5	16.4	75.9	
6. Søren Christensen (24)	1451	1451	15.6	0.1	0.2	1.4	13.9	0.5	1.3	9.3	88.9	Danish soldiers
7. Own investigations	1475	2152	50.0	4.4	0.9	10.7	34	8.7	1.8	22.3	67.2	

Table 5.

Occurrence of pneumococcus in healthy people. Distribution of types.  
Frequency in the different seasons of the year.

	1938					1939					Total
	June July Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May- Sept.	
Number of tests.	136	204	269	250	172	232	227	272	140	250	2152
Pneumococcus carriers. (Strains of pneumococcus)	54	106	155	119	99	121	101	136	77	107	1075
	(107)	(160)	(122)	(101)	(125)	(103)	(138)	(82)	(107)	(1099)	
Type 1	7	19	19	12	7	8	4	5	2	11	94
2		2	5		2	6	1	3			19
3	20	22	21	28	25	32	26	21	19	17	231
4	2		2	2	2	3		1	1	2	15
5											—
6	2	7	17	9	7	3	2	10	8	10	75
7	1	1	3	1	1			2		3	12
8	4	2	7	10	3	13	6	9	11	12	77
9			3	2	1	2	4	5	3	1	21
10		1			1	1		1	3	1	8
11		1	3	5	1	2	1			2	15
12											—
13	5	3	7	6	13	10	13	8	8	2	75
14			1		1	1	1	3		5	12
15	2	4	7	5	5	4	9	7		4	47
16	1	13	16	11	5	8	7	10	4	3	78
17	1	1	3	1	1	1		3	3	5	19
18	3	2	1	2	3	5	3	2	5	11	37
19	1	1	7	5	5	5	8	13	7	9	61
20	1	3	3	7	7	8	8	11	1		49
21											—
22	1	9	9	2	6	3				1	31
23					1		1	1			3
24	1	1	3				3	9		1	18
25		1									1
27										2	2
28		5	4	3	1	1	1	1	1	1	18
29	1	8	9	5	2	7	2	4	4	3	45
31				1				4			5
32	1										1
?		1	10	5	1	2	3	5	2	1	30

percentage of positive samples was about 48. This is in rather fair agreement with the results obtained by others.

The material is first gathered in *table 4*. Here the three first types only are represented for comparison with previous investigations. The agreement between earlier investigations and our own is a fairly good one. As for type 3 there are several others who have arrived at similar high figures. Type 2 was rather unfrequently found by us. Only type 1 we observed considerably more often than previous investigators. This fact is puzzling, and we shall return below to the possible causes of the discrepancy.

In *table 5* we find the occurrence of the different types in the different seasons and jointly. Type 3 is, as was to be expected, the most frequent type. Next comes type 1. In group IV there are no particularly predominant types. Types 16, 8, 6 and 13 are the most common ones, and were found almost equally often. Merely three types were not observed in Sauda, viz. types 5, 12 and 21. These three types have previously been found in Oslo. The spread thus is rather wide even in so isolated a place as is Sauda. A number of strains, in all 30, we were unable to classify serologically. Nine of these were overgrown by other microbes or died before we had been able to type them. The other 21 strains however were studied thoroughly, but did not give any reaction with any of our sera. These strains we must be allowed to regard as *new types* besides the 30 known. Four of them were studied further:

They are all Gram positive, faintly lanceolate diplococci with a definite capsule. On blood-agar they grow in green colonies that are more distinctly mucoid than those of the usual pneumococci. They split inulin, are dissolved by bile and are pathogenic in white mice. We prepared immune serum from rabbits, but their titer values were not very high. The highest titer values obtained are to be seen from the *table 6*.

Cross-agglutination between the four strains analyzed and their serums is rather convincing. The non-diluted or moderately diluted serum gave the usual Neufeld reaction. None

Table 6.  
Agglutination of 4 unknown strains.

	Serum 402/38	Serum 512/38	Serum 1253/39	Serum 1634/39
Strain 402/38	1/80	1/160	1/160	1/80
Strain 512/38	1/80	1/160	1/160	1/160
Strain 1253/39	1/160	1/80	1/160	1/80
Strain 1634/39	1/160	1/160	1/160	1/160

of the known types of pneumococci agglutinates in these serums. The four strains described thus belong to the same new serological type. Later this type has also been observed by Jon Björnsson in Oslo.

When studying the incidence of pneumococci in the different seasons (table 5 and *the diagram*), one find the lowest figures in summer. For the rest of the year the figures are higher, but show considerable variations from one month to the other, the figure for February, for instance, being very low. With some of the types one also observes periodical fluctuations.

We will now deal a little more closely with the types that interest us most, namely type 1 and 3. The highest figure observed for type 1 (9 %) was found in September. This high percentage was seen after a series of type 1 pneumonias during the preceding months. In the course of the following months the number of type 1 carriers slowly decreased to 1 %. It seems reasonable to assume that the great number of type 1 carriers, found in the first part of the period of investigation, may be seen in relation with the epidemic of type 1 pneumonias immediately preceding the investigation. One may suppose that infections with type 1 were rather common in the months from May till September, and that



Table 7.

The occurrence of pneumococcus in 642 healthy school children.

[illegible]

Table 7.

Distribution of types. Distribution in the different classes.

13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		Total
24	19	19	24	21	16	24	17	19	27	32	40	65		642
13	10	13	21	11	10	14	6	10	14	11	23	40		343
					(13)		(7)	(11)				(42)		(351)
3	1	2	2	1	3	1	1	1			2	2		40
		1								2		1		8
1	2	2				2	2	1	3	1	3	6		56
														2
		3	4	1	1			1	2	1	2	1		—
											1	1		25
	1		2	1		1		2			1			4
						1	1				1			11
						1	1		1			3		9
1		1	1			1		2						1
														7
1		1	2				1	1	1			3		—
												2		16
1			1		1	1		1	1			4		3
1		2	5	2	3		1	2		2	3			14
						1			1					36
														4
1			2		1	3				2				5
1				1	1	1			1	3	2	1		14
3	2			3		1			1		6	2		17
														—
					1							1		18
												9		1
														13
														1
	3					1	1				1			—
		1												7
			1	1										21
												4		4
	1		1	1					2		1	1		—
								1			1	3		14

susceptible individuals caught their pneumonia during the first part of this period. This may explain the lack of agreement between previous investigations and our own as far

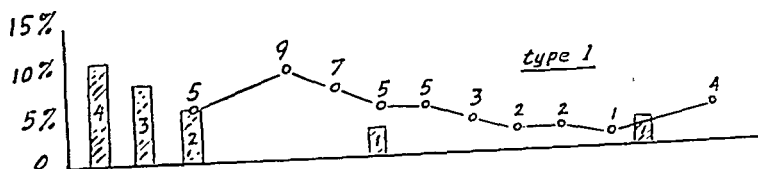
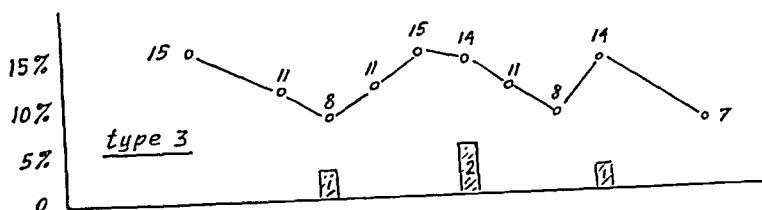
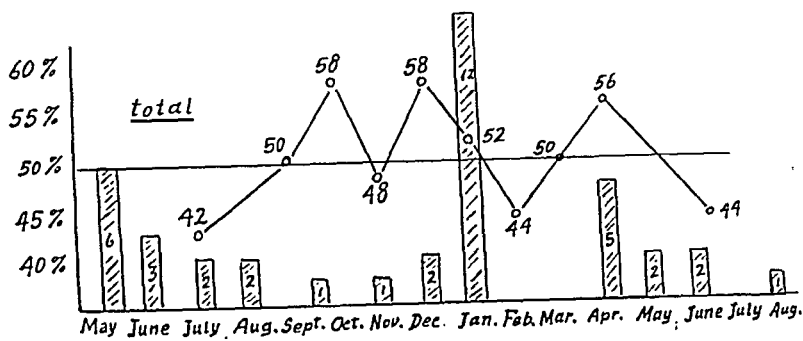


Diagram. Pneumonia and pneumococcus carriers in different seasons 1938-39. The diagrams show the pneumococcus carriers in % of all tests. The columns show cases of pneumonia in the same time.

as the type 1 carriers are concerned. Earlier investigators have worked in large cities with other possibilities of infection, and not in such an isolated village like Sauda, with its population, small in number, exposing itself to infection by frequent meetings and intercourse. — In the later part of the period of investigation only two cases of type 1 pneu-

monia were observed, one in November and the other in May. The very last section of the curve again shows a little increase of the number of type 1 carriers. It is most likely to suppose that one here has to deal with an infection by contact, as four of the eleven type 1 carriers were pupils in the same school-class. One of these had a pneumonia 2—3 months earlier, but unfortunately he was not examined bacteriologically then.

The curve for the type 3 carriers rises and falls moderately without any distinct relation to the cases of pneumonia observed. Neither does the total material show any definite relation between the number of pneumococcus carriers and the cases of pneumonia.

Of the healthy persons examined 642 were school children (*table 7*). Here only the first-time examinations are included. The distribution of the types does not differ noteworthy from that in the total material. Type 1 occurs somewhat more frequently than corresponds to its average occurrence (6.2 %). The investigation was however carried out in the period from September till November 1938 (see the diagram), thus subsequent to a period with type 1 pneumonias.

In order to study the conditions of infection a little more closely we have in *table 7* taken each class separately. A considerable spread shows to exist, and very seldom one finds one and the same type in a larger number of the school children.

We have also examined a number of persons regularly every month in order to inquire whether there were larger variations in one and the same individual. 67 persons were studied in this manner (*table 8*). Cases 1—55 are two classes of school children, while cases 56—67 are nurses and doctors at the hospital. Among the 67 persons examined there were (after 9 single examinations) only four in whom pneumococci were not found (cases 17, 44, 62 and 67). In the remaining 63 (=94 %) pneumococci were demonstrated at one or several subsequent examinations, but frequently the

Table 8.

Monthly examinations of 67 persons.

	1938				1939					Remarks
	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Febr.	Mar.	Apr.	June	
No. 1	16	13	—	13	13	8	8	8	8	
2	3	3	3	3	3	3	8	8	8	
3	22	—	15	15	—	9	16	—	—	
4	—	6	6	—	—	—	—	—	20	
5	—	—	—	—	16	H	16	—	—	
6	—	28	—	—	2	—	—	—	—	
7	—	15	—	—	13	13	—	13	—	
8	—	17	—	—	—	—	13	13	—	
9	—	15	16	16	16	16	8	8	8	
10	29	29	—	20	20	S	17	—	—	
11	—	16	—	—	—	—	—	—	—	
12	—	1	1	1	1	1	1	6	6	
13	10	15	—	—	15	—	17	17	8	
14	22	3	3	3	3	—	3	3	3	
15	16	—	15	15	15	15	15	?	15	
16	16	3	3	3	3	3	3	3	3	
17	—	—	—	—	—	—	—	—	S	
18	—	—	16	—	—	16	—	—	—	
19	22	19	—	23	S	23+24	9	6	17	
20	3	3	3	3	3	3	3	9	3	
21	—	—	—	—	—	—	—	17	—	
22	17	17	3	3	3	—	—	17	17	
23	1	1	6	6	—	6	6	6	15	
24	1	3	16	3	3	3	3	3	3	
25	3	3	3	—	—	14	—	8	—	
26	28	—	3	8	8	8	H	8	17	
27	—	3+22	—	—	3	3	3	3	11	
28	1	1	1	14	—	1	1	1	6	
29	1	1	1	1	1	—	1	—	6	
30	3	3+28	—	—	19	19	—	19	—	
31	S	—	—	15	—	—	—	8	8	
32	—	S	2	16	—	—	—	—	15	
33	2	2	—	16	—	—	—	—	—	
34	—	—	—	—	29	20	6	—	—	
35	1	7	—	—	—	—	—	—	—	
36	6	6	—	19	19	19	19	19	19	

(Table 8 continues)

(Table 8 continued)

	1938				1939					Remarks
	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Febr.	Mar.	Apr.	June	
37	16	16	16	—	—	19	19	19	19	
38	—	1	8	8	8	8	8	8	8	
39	1	29	29	—	1	13	13	13+29	14	
40	—	—	11	10	3	—	10	29	14	
41	—	—	1	1	—	13	—	13	S	
42	—	—	—	—	—	3	—	—	8	
43	—	S	3	3	3	—	—	6	6	
44	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
45	—	—	—	—	—	16	16	—	6	
46	3	6	3	6	6	3	3	—	3	
47	8	6	6	6	8	—	6	6	—	
48	6	3	8	3	—	3	3	3	3+16	
49	—	6	—	13	13	13	—	13	13	
50	3	8	3	3	10	16	16	16	16	
51	—	—	20	1	—	—	—	—	8	
52	6	6	13	6	—	3	3	3	—	
53	6	1	—	3	3	13	13	3	15	
54	28	28	—	13	8	8	8	8	8	
55	28	?	—	11	S	—	19	—	—	
56	3	3	3	3	3 NB	3	3	3	3	Pn. croup.
57	—	—	—	—	3	3	—	—	3	
58	3	—	—	3	3	6	—	6	6	
59	—	—	—	—	3	3	—	—	—	
60	—	—	—	—	3	3	—	3	3	
61	19	19	19	19	—	—	—	—	—	June 38: type 20
62	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
63	3	19	19	—	19	19	19	—	—	
64	18	8	18	18	18	18	18	18	18	
65	—	15	15	15	15	15	15	—	—	
66	—	?	?	—	—	?	—	—	—	
67	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Legend: H : hemolytic streptococcus.

S : sich, not tested.

Nos. 1—31 and 32—55 are two classes of school children.

Nos. 56—67 are nurses and doctors at the hospital.

? : pneumococci not determined serologically.

types changed rather rapidly. In case 19 we found thus, on making 8 examinations, 7 different types.

Previous investigators have tried to classify the material under the headings »chronic carriers«, »non carriers« etc. (25, 26). One must assume a certain individual disposition which partly may be responsible for the results obtained, but, nevertheless, we do not find this distinction a very natural one. We think it might rather look like special types having a tendency to become sessile for longer periods of time than others. This is, before all, true of type 3. This quality has also been observed with other types, e. g. types 1, 8, 15, 18 and 19. To give an explanation of this different behaviour may be rather difficult though. It is possible that there is a relation to the fact that these types are the commonest. Yet the explanation might also be that these types are the most virulent ones in mice, and are thus those most easily detectible with the method used by us. It may be mentioned though that, when type 1 was found in healthy subjects, often this type first caused the death of the mouse after four or five days, or not at all, so that the type could only be demonstrated in subcultures obtained from the mouse after we had killed the latter.

It seems likely that very often several types are present at the same time, but that only the most virulent one is detected by the routine examination. The virulence of the individual types and the number of microbes may possibly vary somewhat from day to day, so that by careful examination (e. g. daily for a week) one might have been able to demonstrate a larger number of types, and maybe not a few more pneumococcus carriers than we have been able to find. On one single occasion we have even succeeded to demonstrate four types coincidently. By careful examination Gundel & Okura (27) too found more than one serological type in about one-third of their cases.

A question of great interest to us has been whether the workers and employees of the factory were especially predisposed to pneumococcus infections (*table 9*), and whether

there was any difference with regard to the different districts, in other words, whether there was any evidence as to the smoke having any importance for the spreading of the pneumococci and pneumonias.

From table 9 it is to be gathered that among the workmen

Table 9.

Occurrence of pneumococci in the workers and employees of the factory at Sauda, compared with the population at different, partly very remote, places (Hellandsbygd 10 km and Ölen about 80 km from Sauda).

	Workers at the E. F. P. Co.	Employees at the E. F. P. Co.	School- children at Aböbyen	Sauda- sjöen	Hellands- bygd	Ölen
Number of samples	315	66	478	140	40	86
Pneumococcus carriers	168 (53%)	26 (39%)	255 (53%)	70 (50%)	23 (58%)	36 (42%)
Number of strains	(174)		(261)	(72)		(37)
Type 1	9	2	38	1	2	7*
2	7	—	5	2	—	—
3	44	11	43	11	3	1

\*) Among these is a boy who had a pneumonia 2—3 months in advance, and three of his class-mates.

pneumococci were found in 53 %. This figure is not higher than that for the school children. Among the employees, who in the offices are highly exposed to the smoke, there were rather few pneumococcus carriers, viz. merely 39 %. The highest figure (58 %) was observed in a rather out-of-the-way place, Hellandsbygden, situated about 10 km (in a straight line) from the factory, and where smoke seldom, if ever, is demonstrable. At another, still more remote place, at Ölen, we find 42 % carriers. Our material from the two last mentioned places, however, is pretty small.

In table 10 we have gathered our findings according to districts. Here the number of pneumonia cases observed is recorded too. The district of Birkeland, situated near the



Table 10.

Pneumonias and pneumococcus carriers in different districts in Sauda.

	Inhabitants Jan. 1.—38.	Subjects examined	Pneumococcus demonstrated in		Number of croupous pneumonias	
					1930—37	Jan. 1. 38— Aug. 30. 39.
Åbøbyen	1096	503	231	46%	74	15
Øyra	775	164	72	44%	60	14
Birkeland	407	89	50	57%	30	4
Brekke Austerheim	297	72	28	39%	12	1
Åbødalen	395	97	56	58%	15	2
Fløgstad Kalhagen	557	159	90	57%	28	5
Saudasjøen and vicinity	743	189	83	44%	54	10
Hellandsbygd	220	42	24	57%	18	1
Sauda in all	4490	1315	634	48%	291	52
Outside of Sauda		160	72	45%		
Total number of examinations		1475	706	47,9%		

factory and in a direction the smoke most frequently is blowing, has a relatively large number of pneumococcus carriers, particularly compared with Brekke-Austerheim, which lies higher and freer. But on the whole the variations are small and do not point in any definite direction. — As to the number of pneumonia cases observed during the last 20 months, there are no variations to be seen that might be brought into relation with the number of carriers.

To conclude, we want to thank the board of the factory

at Sauda (Electric Furnace Products Company, Limited) for the economical support granted us, as well as the medical students Rolf Dörum and Olaf Odd for their assistance in collecting the material, and finally dr. Erik Waaler for his helpful advice.

---

### *Summary and Conclusions.*

The authors' report of investigations on pneumonia and pneumococcus carriers in a small and isolated community (Sauda in Norway), where during the last 15 years there have been exceptionally many cases of croupous pneumonia with a high mortality.

The material consists of 46 cases of croupous pneumonia and 2152 samples obtained from the throats of 1475 healthy persons.

The pneumonias show a distribution of the types not differing noteworthy from that found in previous investigations. Two cases of croupous pneumonia by autoinfection with type 3 are reported, and further one case of relapse caused by the same type five months after the first pneumonia. Discussion.

In healthy subjects pneumococci were demonstrated in 50 % of all the samples examined. In a number of persons repeatedly examined one observes that the types may shift rather rapidly. Type 3 especially, however, seems to be rather stable, and besides type 3 is the type most frequently found, namely in 10.7 % of all the samples taken. This figure lies towards the upper limit of what has been found by previous investigators. Type 1 shows a considerable higher incidence in our material than in that of previous investigators.

The workers and employees of the factory (production of ferro-alloys, especially ferromanganese by electric melting) do not seem to be more strongly exposed to infection with pneumococci than the rest of the population of Sauda, and any reliable differences between districts exposed to the smoke

from the factory to a varying extent cannot be seen either. In healthy subjects a new serological type of pneumococci was detected.

# LITERATURE.

- Benjamin White*: The Biology of pneumococcus. New York 1938.
1. *Axel Holst*: Tidsskrift for den norske lægeforening 1929:49:559.
  2. *Jul. Riddervold*: Norsk mag. f. lægev. 1930:91:731.
  3. *P. M. Holst*: Tidsskrift for den norske lægeforening 1930:50:427.
  4. *Dagfinn Elstad*: Vortrag. Bericht über den VIII. internationalen Kongress für Unfallsmedizin und Berufskrankheiten. Frankfurt a. M. 1938.
  5. — Nordisk Medisin 1939:3:2527.  
Discussion: Nordisk Medisin 1939:3:2544.
  6. *Pasteur*: Bull. Acad. de med., Jan. 1881.
  7. *Pasteur, Chamberland & Roux*: Compt. rend. Acad. d. sc. 1881:92:159.
  8. *Axel Ström*: Norsk mag. f. lægev. 1931:92:1208.
  9. — J. Inf. Dis. 1932:50:430.
  10. *Kr. Skajaa*: Influenta og influensapneumoni. Supplement to Medisinsk Revue 1921.
  11. *Th. Thjøtta & Ó. Hanneborg*: Norsk mag. f. lægev. 1924:85:345.
  12. — — J. Inf. Dis. 1924:34:454.
  13. *Erik Waaler & Knut Halvorsen*: Nord. med. tidsskr. 1938:16:1889.
  14. *Maynard*: Publ. South African Inst. M. Research, Nov. 1913.
  15. *Lister*: Publ. South African Inst. M. Research, April 1935.
  16. *Cecil & Austin*: J. Exper. Med. 1918:28:19.
  17. *Cecil og Vaughan*: J. Exper. Med. 1919:29:457.
  18. *Neufeld & Etinger-Tulczynska*: Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankheiten 1931:112:492.
  19. *Dochez & Avery*: J. Exper. Med. 1915:22:105.
  20. *Stillman*: J. Exper. Med. 1916:24:651.
  21. *Rosenau, Felton & Atwater*: Am. J. Hyg. 1926:6:463.
  22. *Powell, Atwater & Felton*: Am. J. Hyg. 1926:6:570.
  23. *Gundel*: Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr. 1933:114:659.
  24. *Sören Christensen*: Studies on Pneumococcus types. Copenhagen 1923.
  25. *Webster & Hughes*: J. Exper. Med. 1931:53:535.
  26. *Bliss, McClaskey & Long*: J. Immunol. 1934:27:95.
  27. *Gundel & Okura*: Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr. 1933:114:678.

# EINIGE IMMUNISIERUNGSVERSUCHE MIT »RATIN«-KULTUREN

Von *L. Bahr*.

(Eingegangen bei der Redaktion am 28. Mai 1942).

Ich habe früher einige Mitteilungen (1—3) über die Virulenzverhältnisse einer Salmonellabakterie veröffentlicht. Diese Untersuchungen sind später weitergeführt worden, und die Versuche, die hier besprochen werden sollen, stellen ein Glied derselben dar und wurden mit der gleichen Salmonellabakterie (*S. enteritidis* var. *danzysz* (»Ratin«)) vorgenommen. Sie gingen darauf hinaus, zu untersuchen, ob weisse Mäuse und graue Hausmäuse, die eine perorale Infektion mit dieser Bakterie überlebt hatten oder (Versuchsreihe XVI—XVIII mit weissen Mäusen) mehrere Male mit getöteter Kultur subkutan injiziert worden waren, immun geworden waren, so dass sie später einer peroralen Infektion widerstehen konnten.

Bei früher unternommen, sehr umfassenden Fütterungsversuchen hat es sich gezeigt, dass sowohl weisse Mäuse als auch graue Hausmäuse für diese Bakterienkultur, wenn sie virulent war, sehr empfänglich waren, indem 0,5 cm<sup>3</sup> einer 2‰ Glucose-Liebigs-Fleischextrakt-Pepton-Bouillon-Kultur 37° C. 24h (D. B. K.), die ich immer angewandt habe und die auch hier Anwendung gefunden hat — in ein Stückchen Weissbrot (1,0 g) eingesogen und so an die Mäuse verfüttert — in allen Fällen eine tödlich verlaufende Septikämie, Enteritis (in

verschiedenen Graden), und in der Regel Milzschwellung hervorrief. Der Tod trat in den allermeisten Fällen im Laufe von 2—9 Tagen ein, in einigen Fällen etwas später (10—14 Tage) und in vereinzelt seltenen Fällen erst nach ca. 3 Wochen. Bei Aussaat aus dem Blut oder dem Milzsaft der toten Mäuse auf Lackmus-Laktose-Agar kam es in fast allen Fällen zu kräftigem Wachstum der Bakterie (Reinkultur); nur selten gab es kein Wachstum aus dem Blut, und noch seltener war nur spärliches Wachstum aus der Milz.

Es wurden für die Versuche, von denen hier berichtet werden soll, im ganzen 140 weisse Mäuse und 17 Hausmäuse sowie 18 Reinkulturen der Bakterie: *S. enteritidis* var. *danzysz* (Ratin) angewandt, welche letzteren unmittelbar vorher aus dem Blut von 11 weissen Ratten, 2 grauen Wanderratten und 5 weissen Mäusen, die an peroraler Infektion mit D. B. K. gestorben waren, gezüchtet wurden.

Jede Maus wurde in einem Mäuseglas mit etwas Holzwolle angebracht und mit der in ein Stückchen Weissbrot eingesogenen D. B. K. (der angeführten Dosis) gefüttert, nachdem man sie  $\frac{1}{2}$  Tag hatte hungern lassen, um sicher sein zu können, dass alles im Laufe von kurzer Zeit aufgenommen werden würde. Das Durchschnittsgewicht der weissen und grauen Mäuse war ca. 17 g bzw. ca. 20 g.

Was übrigens die Dosis betrifft, so war es notwendig, bedeutend geringere Mengen D. B. K. als  $0,5 \text{ cm}^3$  zu geben, da man ja wünschte, dass ein Teil der Mäuse die Infektion überleben sollte; deshalb wurden Dosen von  $0,05 \text{ cm}^3$ ,  $0,002 \text{ cm}^3$  oder noch kleinere angewandt. Bei Reinfektionen wurde natürlich eine etwas grössere Dosis als bei der 1. Infektion verabreicht, weil die Mäuse in der Beobachtungsperiode oft zu Gewicht zugenommen hatten und es natürlich erschien, die frühere Dosis zu vergrössern, von der nicht zu erwarten war, dass sie einen Ausschlag bei der Reinfektion geben würde. Den grauen Hausmäusen wurden grössere Dosen gegeben, u. a. deswegen weil ihr Gewicht in der Regel grösser war als das der weissen Mäuse.

Die peroral infizierten Mäuse, die die Infektion überlebten, waren anscheinend von derselben nicht besonders beeinflusst, aber in der Regel konnte man beobachten, dass sie am 1. oder 2. Tage nach der Fütterung mit der Kultur die Fresslust verloren und in einzelnen Fällen einige Tage Durchfall bekamen; doch verschwanden diese Symptome bald. Die allerkleinsten Dosen ( $0,0005 \text{ cm}^3$ ) verursachten nur geringe Symptome, die bei den die Infektion überlebenden Mäusen bald verschwanden.

Nach einer Beobachtungsperiode von 20—97 Tagen nach der 1. Infektion wurde die 1. Reinfektion vorgenommen, und die danach überlebenden Mäuse wurden zum 2. Mal 27—43 Tage nach der 1. Reinfektion reinfiziert (s. im übrigen die Übersicht: Versuchsreihe I—XV).

Was die vier ersten Versuchsreihen anbelangt (I—IV), so wurde die Reinfektion — wie unten ersichtlich — mit recht grossen Dosen D. B. K. vorgenommen. Das lag daran, dass diese Versuche von orientierender Natur waren; aber sie sind mitgenommen, weil sie zusammen mit den übrigen Versuchen nicht ohne Interesse sind.

In den Versuchsreihen XVI—XVIII mit subkutanen Injektionen von getöteter Kultur in weisse Mäuse fanden D. B. K. (oder B. K.) Anwendung, in welchen die Bakterien vorher durch 20 Minuten Erhitzung in strömendem Wasserdampf ( $100^\circ \text{ C.}$ ) getötet waren; die stattgefundene Abtötung der Bakterien wurde durch Aussaat von  $2 \text{ cm}^3$  der erhitzten Kultur in  $100 \text{ cm}^3$  steriler Glucose-Bouillon bei 3tägiger Beobachtung ( $37^\circ \text{ C.}$ ) kontrolliert.

Die Mäuse wurden 3 mal mit passenden Zeit abständen (siehe Übersicht) mit getöteeter Kultur injiziert, und 12—32 Tage nach der letzten Injektion wurden die überlebenden Mäuse peroral mit D. B. K. infiziert.

Folgende rein orientierenden Agglutinationsversuche mit Blutserum von peroral infizierten Mäusen und der angewandten Bakterienkultur sind vorgenommen worden:

	Serumverdünnung					
	Kontrolle	1/20	1/40	1/80	1/160	Beob.
Maus <i>d</i> Dosis Kultur 0,005 cm <sup>3</sup>						
per os Blut 9 Tage später ....	0	0	0	0	0	24 Std.
Maus <i>f</i> Dosis Kultur 0,005 cm <sup>3</sup>						
per os Blut 9 Tage später ....	0	0	0	0	0	»
Maus <i>g</i> Dosis Kultur 0,0001 cm <sup>3</sup>						
per os Blut 9 Tage später ....	0	0	0	0	0	»
Maus <i>j</i> Dosis Kultur 0,0005 cm <sup>3</sup>						
per os Blut 9 Tage später ....	0	0	0	0	0	»

Agglutinationsversuche mit Blutserum von Mäusen, die einmal mit abgetöteter Kultur injiziert worden waren:

	Serumverdünnung					
	Kontrolle	1/20	1/40	1/80		Beob.
Maus <i>c</i> Dosis † Kultur 0,1 cm <sup>3</sup>						
subk. Blut 18 Tage später ....	0	(+)	0	0		24 Std.
Maus <i>d</i> Dosis † Kultur 0,05 cm <sup>3</sup>						
subk. Blut 18 Tage später ....	0	(+)	?	0		»
Maus <i>e</i> Dosis † Kultur 0,01 cm <sup>3</sup>						
subk. Blut 18 Tage später ....	0	(+)	?	0		»
Maus <i>f</i> Dosis † Kultur 0,01 cm <sup>3</sup>						
subk. Blut 18 Tage später ....	0	0	0	0		»
Maus <i>g</i> Dosis † Kultur 0,01 cm <sup>3</sup>						
subk. Blut 12 Tage später ....	0	0	0	0		»
Maus <i>i</i> Dosis † Kultur 0,01 cm <sup>3</sup>						
subk. Blut 12 Tage später ....	0	0	0	0		»
(0 = keine Agglutination; (+) schwache Agglutination).						

Es konnte also nur sehr wenig oder gar kein Agglutinin in den untersuchten Mäuse-Blutsera nachgewiesen werden.

Es seien im übrigen noch folgende Einzelheiten über die Versuche angeführt:

#### A. Perorale Infektion und Reinfektion mit Glucose-Bouillon-Kulturen (D. B. K.):

##### Versuchsreihe I:

10 weisse Mäuse: a—j (Gewicht 15—19 g): Perorale Inf.

D. B. K. 239a (Blut, Kolonie) mit fallenden Dosen: 0,5—0,001 cm<sup>3</sup>. 8 Mäuse (a—h) starben an der Infektion (Dosen 0,5—0,05, 0,005 und 0,002 cm<sup>3</sup>) — 7 im Laufe von 7—12 Tagen und 1 nach 22 Tagen —; 2 Mäuse: i und j, beide peroral infiziert mit 0,001 cm<sup>3</sup>, überlebten die Infektion und wurden 46 Tage nach der 1. Infektion reinfiziert (Dosis pr. Maus 1,0 cm<sup>3</sup>). Sie starben beide an der Infektion im Laufe von 10—11 Tagen (siehe Übersicht Versuchsreihe I).

#### *Versuchsreihe II:*

12 weisse Mäuse: a—l (Gewicht 16—19 g): Perorale Infektion D. B. K. 249b (Blut, Kolonie) mit fallenden Dosen: 0,5—0,001 cm<sup>3</sup>. 11 Mäuse a—i sowie k und l starben an der Infektion (Dosen 0,5—0,05—0,005—0,002 und 0,001 cm<sup>3</sup>) im Laufe von 4—9 Tagen. Eine Maus (j), peror. infiziert mit 0,001 cm<sup>3</sup>, überlebte die Infektion und wurde 20 Tage nach der 1. Infektion reinfiziert (Dosis 1,0 cm<sup>3</sup>); sie starb innerhalb 8 Tagen an der Infektion (siehe Übersicht V. R. II).

#### *Versuchsreihe III:*

12 weisse Mäuse: a—l (Gewicht 16—19 g): Perorale Infektion D. B. K. 266a (Blut, Kolonie) mit fallenden Dosen 0,002—0,0005 cm<sup>3</sup>. 4 Mäuse starben an der Infektion: 3 Mäuse a b c (Dosis 0,002 cm<sup>3</sup>): a und c starben im Laufe von 9—13 Tagen an der Infektion, b blieb am Leben. 3 Mäuse d, e, f (Dosis 0,001 cm<sup>3</sup>): d und f starben nach 10—24 Tagen an der Infektion, während e leben blieb. Die übrigen 6 Mäuse (g—l), alle peror. infiziert mit 0,0005 cm<sup>3</sup>, blieben am Leben.

Im ganzen überlebten also 8 Mäuse die Infektion; dieselben wurden 42 Tage nach der 1. Infektion reinfiziert (Dosis pr. Maus 0,5 cm<sup>3</sup>). 6 der Mäuse starben an der Infektion im Laufe von 7—10 Tagen, 2 Mäuse (g und j) überlebten sie und wurden wieder 27 Tage nach der 1. Reinfektion peror. infiziert (Dosis pr. Maus 2,0 cm<sup>3</sup>); sie starben beide im Laufe von 4—12 Tagen an der Infektion. Im Blut konnte die Bakterie nicht nachgewiesen werden; aus der Milz von j entstan-



den nur 2 Kolonien auf Agar-Agar, aus der Milz von g dagegen kräftiges Wachstum der Bakterie (siehe Übersicht Versuchsreihe III).

#### *Versuchsreihe IV:*

12 weisse Mäuse: a—l (Gewicht 12—17 g): Perorale Infektion D. B. K. 274a Blut mit fallenden Dosen: 0,005—0,0005 cm<sup>3</sup>. 4 Mäuse (a, f, i und j) starben an der Infektion (Dosen 0,005 und 0,001 cm<sup>3</sup>) nach 10—11 Tagen. Maus l (0,005 cm<sup>3</sup>) starb nach 31 Tagen, aber aus einem anderen Grunde. Die 7 überlebenden Mäuse wurden 38 Tage nach der 1. Infektion reinfiziert (Dosis: 0,5 cm<sup>3</sup> pr. Maus); alle starben infolge der Infektion im Laufe von 7—16 Tagen (siehe Versuchsreihe IV-Übersicht).

#### *Versuchsreihe V:*

12 weisse Mäuse: a—l (Gewicht 14—17 g): Perorale Infektion D. B. K. 297a Milz mit fallenden Dosen: 0,05—0,0005 cm<sup>3</sup>. 10 der Mäuse starben an der Infektion nach 7—11 Tagen, 1 Maus nach 46 Tagen (andere Ursache), und nur 1 Maus: g (Dosis 0,001 cm<sup>3</sup>) überlebte die Infektion. Diese Maus wurde 90 Tage nach der 1. Infektion reinfiziert (Dosis 0,002 cm<sup>3</sup>) und starb 11 Tage später an der Infektion (s. V. R. V).

#### *Versuchsreihe VI:*

6 weisse Mäuse: a—f (Gewicht 15—17 g). Perorale Infektion D. B. K. 329c Blut mit fallenden Dosen: 0,002—0,0005 cm<sup>3</sup>. 2 Mäuse (a und d: Dosen: 0,002 cm<sup>3</sup> und 0,001 cm<sup>3</sup>) starben nach Verlauf von 9 Tagen an der Infektion. Die 4 überlebenden Mäuse (b, c, e und f) wurden 97 Tage nach der 1. Infektion reinfiziert (Dosen 0,004—0,001 cm<sup>3</sup>); 3 starben an der Infektion, während 1 (e: Dosis 0,001 cm<sup>3</sup>) sie überlebte. Maus e wurde wieder 43 Tage nach der 1. Reinfektion reinfiziert (Dosis 0,01 cm<sup>3</sup>) und starb 10 Tage später an der Infektion (s. V. R. VI).

*Versuchsreihe VII:*

6 weisse Mäuse: a—f (Gewicht 14—15 g): Perorale Infektion D. B. K. 339 1 Blut mit fallenden Dosen: 0,002—0,0005 cm<sup>3</sup>. 5 Mäuse (a, b, c, d und f) starben 8—11 Tage später an der Infektion; 1 Maus: e: Dosis 0,0005 cm<sup>3</sup> überlebte sie, wurde 95 Tage nach der 1. Infektion reinfiziert (Dosis 0,001 cm<sup>3</sup>) und starb im Laufe von 9 Tagen an der Infektion (s. V. R. VII).

*Versuchsreihe VIII:*

10 weisse Mäuse: a—j (Gewicht 12—16 g). Perorale Infektion D. B. K. 256f Blut mit fallenden Dosen: 0,002—0,0005 cm<sup>3</sup>; 3 Mäuse (c, d, e: Dosis: 0,001 cm<sup>3</sup>) starben 9 Tage später an der Infektion; die übrigen 7 wurden 76 Tage nach der 1. Infektion (Dosen: 0,004—0,001 cm<sup>3</sup>) reinfiziert, und alle starben 9—11 Tage später an der Infektion (s. V. R. VIII).

*Versuchsreihe IX:*

6 weisse Mäuse: a—f (Gewicht 14—16 g). Perorale Infektion D. B. K. 376c Blut mit fallenden Dosen: 0,002—0,0005 cm<sup>3</sup>. Nur 2 Mäuse c und d (Dosis: 0,001 cm<sup>3</sup>) starben 11—17 Tage später an der Infektion, und 1 Maus (f. Dosis: 0,005 cm<sup>3</sup>) starb 35 Tage danach (aus einem anderen Grunde). Die übriggebliebenen 3 Mäuse wurden 62 Tage nach der 1. Infektion (Dosen: 0,004—0,002 cm<sup>3</sup>) reinfiziert; sie starben alle 9—12 Tage später an der Infektion. Bei Aussaat aus dem Blut von Maus a (Dosis 0,004 cm<sup>3</sup>) entstanden jedoch nur wenige (7) Kolonien. S. V. R. IX.

*Versuchsreihe X:*

6 weisse Mäuse: a—f (Gewicht 12—15 g); Perorale Infektion D. B. K. 363a Blut Kolonie mit fallenden Dosen: 0,002—0,0005 cm<sup>3</sup>. Nur 1 Maus (a: Dosis 0,002 cm<sup>3</sup>) starb 9 Tage später an der Infektion; die übrigen 5 Mäuse (b—f) blieben leben und wurden 62 Tage nach der 1. Infektion reinfiziert (Dosen: 0,004—0,001 cm<sup>3</sup>). Sie starben alle an der Infektion im Laufe von 8—9 Tagen. S. V. R. X.

A: Versuchsreihe I—XV.

*Abkürzungen:*

Bl. = Blut.

Sept. = Septikämie.

Mischw. = Milztumor.

R. = Reinkultur.

Inf. = Infektion.

$W = \text{Wachstum.}$

kr. = kräftiges Wachstum (Agar).

W. = geringer Wachstum (Agar).

O. W. = kein Wachstum (Agar).

[illegible]

IV.	274 a Bl. weisse Ratte	7	b	15	0,005	÷	38	b	20	0,5	† 11 Tg.	, g.W.R. 6Kol.R. ger.W.R. kr.W.R. „ „ „													
			c	17	0,002	÷		c	21	„	† 8 —														
			d	17	„	÷		d	21	„	† 16 —														
			e	12	0,001	÷		e	19	„	† 7 —														
			g	14	„	÷		g	19	„	† 9 —														
			h	15	„	÷		h	21	„	† 9 —														
			k	12	0,0015	÷		k	20	„	† 9 —														
V.	297 a Milz. ws. Ratte	1	g	15	0,001	÷	90	g	22	0,002	† 11 Tg.	Sept. ger. Mschw.													
VI.	329 c Bl. weisse Ratte	4	b	17	0,002	÷	97	b	20	0,004	† 11 Tg.	, 5 Kol.R. Sept. kr.W.R. Mschw.  Sept. kr.W.R. Mschw.	43	e	21	0,01	† 10 Tg.	Sept. ger. Mschw. kr.W. R.							
			c	15	0,001	÷		c	21	0,002	† 9 —														
			e	16	0,0005	÷		e	21	0,001	÷														
			f	15	„	÷		f	16	„	† 9 —														
VII.	339 I Bl. ws. Maus	1	e	14	0,0005	÷	95	e	21	0,001	† 9 Tg.	„													
VIII.	356 f Bl. weisse Maus	7	a	16	0,002	÷	76	a	19	0,004	† 9 Tg.	Sept. Mschw. Sept. ger. Mschw. Sept. Mschw. Sept. ÷ Mschw. Sept. Mschw. „ g.W.R. „ „													
			b	15	„	÷		b	18	„	† 10 —														
			f	15	0,0005	÷		f	18	0,001	† 11 —														
			g	14	„	÷		g	20	„	† 10 —														
			h	13	„	÷		h	21	„	† 10 —														
			i	15	„	÷		i	23	„	† 11 —														
			j	12	„	÷		j	19	„	† 11 —														

Ver- suchs Reihe:	Kultur Nr.	1. perorale Inf.					1. perorale Reinfektion:							2. perorale Reinfektion:							
		Anzahl weisse Mäuse:	Ge- wicht. (g)	Dosis D. B. K. cm <sup>3</sup>	Resultat	Tage nach I. Inf.	W. Weisse Mäuse:	Ge- wicht (g)	Dosis D. B. K. cm <sup>3</sup>	Resultat	Path. Anat.	W aus Blut	W aus Milz	Tage nach I. Reinfek.	W. Maus	Ge- wicht (g)	Dosis D. B. K. cm <sup>3</sup>	Resultat	Path. Anat.	W aus Blut	W aus Milz
IX	376 c Bl. ws. Maus	a	16	0,002	÷		a	20	0,004	+ 9 Tg.	Sept. Mschw.	7 Kol. R.									
		b	15	"	÷	62	b	15	"	+ 9 Tg.	"	g.W.R.									
		c	16	0,0005	÷		e	16	0,002	+ 12 Tg.	"	kr. W. R.									
X	363 a Bl. Kol. ws. Ratte	b	15	0,002	÷		b	15	0,004	+ 9 Tg.	Sept. Mschw.	kr. W.R.									
		c	14	0,001	÷		c	12	0,002	+ 9 Tg.	"	g.W.R.									
		d	13	"	÷		d	14	"	+ 8 Tg.	Sept. ger.	"									
		e	14	"	÷	62	e	15	0,001	+ 9 Tg.	Mschw.	kr. W.R.									
		f	14	0,0005	÷		f	16	"	+ 8 Tg.	Sept. ger. Mschw.	"									
XI	396 a Bl. ws. Maus	1 e	15	0,0005	÷	47	e	16	0,001	+ 9 Tg.	Sept. Mschw.	kr. W.R.									
XII	413 f Bl. ws. Maus	1 f	18	0,0005	÷	27	f	19	0,001	÷				43	f	16	0,005	+ 8 Tg.	Sept. ger. Mschw.	g. W.R.	kr. W.R.

XIII	9 a Bl. Kol. weisse Ratte	3	b	17	0,002	÷	41	b	20	0,005	† 8 Tg.	Sept. Mschw.	g. W. R. kr. W. R.	kr. W. R.					
			d	16	0,001	÷		d	18	0,002	† 9 »	»	»	»					
			f	17	0,0005	÷		f	17	0,001	† 8 »	»	»	»					
VIX	59 a Bl. weisse Ratte	6	c	22	0,05	÷		c	22	0,5	† 9 Tg.	Sept. Mschw.	kr. W. R.	kr. W. R.					
			d	19	0,005	÷		d	18	0,05	† 8 »	»	»	»					
			e	24	»	÷	48	e	16	»	† 8 »	»	O. W.	»					
			f	18	0,001	÷		f	21	»	† 7 »	»	kr. W. R.	kr. W. R.					
			g	25	»	÷		g	24	»	† 10 »	»	»	»					
			i	26	»	÷		i	29	»	† 12 »	»	»	g. W. R.					
XV	63 i Bl. wan- der Ratte	5	b	15	0,05	÷		b	15	0,5	† 6 Tg.	Sept. Mschw.	O. W.	kr. W. R.					
			d	13	0,005	÷	32	d	13	0,05	† 5 »	»	kr. W. R.	»					
			e	15	»	÷		e	15	»	† 6 »	»	»	»					
			f	16	0,001	÷		f	17	»	† 6 »	»	»	»					
			h	19	»	÷		h	19	»	† 6 »	»	»	»					

*Versuchsreihe XI:*

6 weisse Mäuse a—f (Gewicht 14—16 g). Perorale Infektion D. B. K. 396a Blut mit fallenden Dosen: 0,002—0,0005 cm<sup>3</sup>. 5 Mäuse: a, b, c, d und f starben 6—17 Tage später an der Infektion; die übriggebliebene Maus e: Dosis 0,0005 cm<sup>3</sup>, die die Infektion überlebte und 47 Tage später nach der 1. Infektion reinfiziert (Dosis: 0,001 cm<sup>3</sup>) wurde, starb nach 9 Tagen an der Infektion. S. V. R. XI.

*Versuchsreihe XII:*

6 weisse Mäuse a—f (Gewicht 16—18 g). Perorale Infektion D. B. K. 413f Blut mit fallenden Dosen 0,002—0,0005 cm<sup>3</sup>. 2 Mäuse a und b (Dosis 0,002 cm<sup>3</sup>) starben an der Infektion nach 13—16 Tagen. 2 Mäuse c und d (Dosis 0,001 cm<sup>3</sup>) starben nach 24 Stunden (Endotoxinwirkung?), und 1 Maus: e (Dosis 0,0005 cm<sup>3</sup>) starb nach 11 Tagen an der Infektion. Maus f, die die Infektion überlebte (Dosis 0,0005 cm<sup>3</sup>), wurde 27 Tage nach der 1. Infektion reinfiziert (Dosis 0,001 cm<sup>3</sup>) und blieb am Leben; sie wurde nach 43 Tagen nochmals reinfiziert (Dosis 0,005 cm<sup>3</sup>) und starb im Laufe von 8 Tagen an der Infektion.

*Versuchsreihe XIII:*

6 weisse Mäuse (Gewicht 16—17 g). Perorale Infektion D. B. K. 9a Blut Kolonie mit fallenden Dosen: 0,002—0,0005 cm<sup>3</sup>. 3 Mäuse a, c, e (Dosen 0,002 cm<sup>3</sup>, 0,001 cm<sup>3</sup> und 0,0005 cm<sup>3</sup>) starben im Laufe von 7—9 Tagen an der Infektion. Die übrigen 3 Mäuse (b, d und f) wurden 41 Tage nach der 1. Infektion reinfiziert; sie starben alle an der Infektion im Laufe von 8—9 Tagen. S. V. R. XIII.

*Versuchsreihe XIV:*

9 graue Hausmäuse a—i (Gewicht 18—30 g). Perorale Infektion D. B. K. 59a Blut mit fallenden Dosen 0,5—0,001 cm<sup>3</sup>. 3 Mäuse a, b, h starben, a: Dosis 0,5 cm<sup>3</sup> nach 7 Tagen; b: Dosis 0,05 cm<sup>3</sup> und h: Dosis 0,001 cm<sup>3</sup> im Laufe von 14 Tagen, an der Infektion; sie wogen 29—30 g.

Die übrigen 6 Mäuse, die die Infektion überlebten, wurden 48 Tage nach der 1. Infektion reinfiziert (Dosen 0,5—0,05 cm<sup>3</sup>) und starben alle an der Infektion im Laufe von 7—12 Tagen (s. im übrigen V. R. XIV).

#### *Versuchsreihe XV:*

8 graue Hausmäuse (Gewicht 12—19 g). Perorale Infektion D. B. K. 63i Blut mit fallenden Dosen: 0,5—0,001 cm<sup>3</sup>. 2 Mäuse starben an der Infektion, nämlich Maus a (Dosis 0,5 cm<sup>3</sup>) † 7 Tage und Maus c (Dosis 0,05 cm<sup>3</sup>) † 6 Tage; Maus g (0,001 cm<sup>3</sup>) starb nach 14 Tagen (Septikämie, aber keine Milzschwellung; aus dem Blut kein Wachstum auf Agar-Agar). Die übrigen 5 Mäuse, die die Infektion überlebten, wurden 32 Tage nach der 1. Infektion reinfiziert (Dosen 0,5—0,05 cm<sup>3</sup>); sie starben alle im Laufe von 5—6 Tagen an der Infektion (S. V. R. XV).

#### *B. Perorale Infektion mit lebender Kultur nach 3maliger subkutaner Injektion von getöteter Kultur.*

#### *Versuchsreihe XVI:*

10 weisse Mäuse (Gewicht 18—20 g). Subkut. Injektion mit getöteter D. B. K. 172d Blut Kolonie 3mal mit 10—13 Tagen Zwischenraum (s. im übrigen V. R. XVI). Nach der 3. Injektion starben 2 Mäuse a und i (Endotoxinwirkung?). Die übrigen 8 Mäuse wurden 32 Tage nach der letzten Injektion peror. infiziert mit D. B. K. (Dosen 0,5—0,001 cm<sup>3</sup>). Alle starben an der Infektion im Laufe von 5—7 Tagen. 3 Mäuse: sparsames Wachstum aus dem Blut, und bei 1 Maus kein Wachstum.

#### *Versuchsreihe XVII:*

10 weisse Mäuse (Gewicht 15—22 g). Subkut. Injektion mit getöteter D. B. K. 194e Blut Kolonie 3mal mit 12—13 Tagen Zwischenraum (s. im übrigen V. R. XVII). 7 Mäuse starben an der Endotoxinwirkung und 2 an einer zufälligen anderen Infektion; nur 1 Maus (e) überlebte die Injektionen



B: Versuchsreihe XVI—XVIII.

B: Versuchsreihe XVI—XVIII.																				
Versuchsreihe:	Kultur Nr.	Anzahl weisse Mäuse	Perorale Infektion nach dreimal. subkutan. Injektion von + Kultur.										Perorale Infektion mit D. B. Kultur:							
			Subk. Injektion + Kultur										Tage nach letzter Injektion + Kultur:	Maus:	Gewicht. (g)	Dosis D. B. K. cm <sup>3</sup>	Resultat	Path. Anat.:	W aus Blut	W aus Milz
			Maus	28—40—41 cm <sup>3</sup> :	10—11—41 cm <sup>3</sup> :	20—11—41 cm <sup>3</sup> :	b	c	d	e	f	g								
XVI	172 d Bl. Kol. wander- Ratte	8	b	20	0,01	0,02	0,04	32	b	21	0,5	+ 5 Tg.	Sept. Mschw.	2 Kol. R.	O. W.					
			c	20	0,005	0,01	0,02		c	22	„	+ 6 „	„	4 „ R.						
			d	18	0,001	0,002	0,004		d	25	0,1	+ 7 „	„	O. W.						
			e	19	0,0005	0,001	0,002		e	23	„	+ 7 „	„	15 Kol. R						
			f	20	0,0001	0,0002	0,0004		f	20	0,05	+ 7 „	„	kr. W. R.						
			g	19	0,00005	0,00001	0,0002		g	22	„	+ 5 „	„	„						
			h	19	„	„	„		h	21	0,001	+ 7 „	„	„						
			j	20	0,00001	0,00002	„		j	24	„	+ 6 „	„	„						
XVII	194 e Bl. Kol. Ws. Ratte	1	e	18	21—1—42 cm <sup>3</sup> :	5—2—42 cm <sup>3</sup> :	18—2—42 cm <sup>3</sup> :	12	e	20	0,05	+ 8 Tg.	Sept. ger. Mschw.	kr. W. R.	kr. W. R.					
			a	21	16—2—41 cm <sup>3</sup> :	27—2—42 cm <sup>3</sup> :	11—3—42 cm <sup>3</sup> :		a	20	0,05	+ 7 Tg.	Sept. ger. Mschw.	kr. W. R.	kr. W. R.					
XVIII	212 a Bl. Kol. † Bouillon Kultur ÷ Glucose subk. Inj. Weisse Ratte	6	b	19	„	„	„	b	18	0,05	+ 20 „	Sept. Mschw.	2 Kol. R.	15 Kol. R.						
			e	22	„	„	„	e	23	„	+ 7 „	Sept. Mschw.	sp. W. R.	3 Kol. R.						
			g	17	„	„	„	g	17	„	+ 6 „	„	g. W. R.	g. W. R.						
			j	19	„	„	„	j	16	„	+ 6 „	„	g. W. R.	kr. W. R.						
			k	19	„	„	„	k	20	„	+ 7 „	Sept. Mschw.	kr. W. R.	kr. W. R.						

und wurde 18 Tage nach der letzten Injektion mit D. B. K. infiziert (Dosis 0,05 cm<sup>3</sup>). Sie starb an der Infektion im Laufe von 8 Tagen.

#### *Versuchsreihe XVIII:*

10 weisse Mäuse wurden 3mal mit 11—12 Tagen Zwischenraum subkutan mit getöteter Bouillonkultur (s. V. R. XVIII) injiziert. Es wurde bei diesem Versuch glucosefreier Bouillonkultur angewandt, um so weit wie möglich zu vermeiden, dass die Mäuse infolge einer Endotoxinwirkung starben. Trotzdem starben 2 Mäuse hieran sowie 2 Mäuse an einer zufälligen anderen Infektion, so dass nur 6 Mäuse die Injektionen überlebten; diese wurden 12 Tage nach der letzten Injektion peroral mit D. B. K. infiziert (Dosis 0,05 cm<sup>3</sup>). 5 von den Mäusen starben im Laufe von 6—7 Tagen und 1 Maus erst nach 20 Tagen, aber alle infolge der Infektion. Aus dem Blut und der Milz von zwei der Mäuse entstand nur sehr geringes Wachstum der Bakterie auf Agar-Agar.

Von den im ganzen 157 weissen und grauen Mäusen, die die Versuche umfassten, starben also 87 an der Infektion, der Endotoxinwirkung oder an zufälligen anderen Infektionen. Die übrigen 70 Mäuse wurden reinfiziert mit Glukose-Bouillonkultur (12—97 Tage später): 66 von diesen Mäusen gingen an der Infektion zu Grunde, während 4 Mäuse die Infektion überlebten. Diese 4 Mäuse wurden abermals mit Glukose-Bouillonkultur (27—43 Tage später) reinfiziert und starben alle nach 4—12 Tagen an der Infektion; doch gab es aus dem Blute von 2 dieser Mäuse kein Bakterienwachstum auf Agar-Agar, und aus der Milz der einen nur ein sehr spärliches Wachstum.

#### *Zusammenfassung.*

*Das Ergebnis der Versuche ist also, dass es bei diesen Versuchen im grossen und ganzen nicht möglich gewesen ist,*

weisse und graue Mäuse gegen *S. enteriditis* var. *danysz* (Ratinf)-Infektionen zu immunisieren.

## LITERATUR.

- 1) Bahr, L.: Skandinavisk Veterinär Tidskrift 1924.
- 2) — Skandinavisk Veterinär Tidskrift 1926.
- 3) — Zeitschrift für Infektionskr., parasit. Krankh. u. Hygiene d. Haustiere Bd. LIV, Berlin 1938.

## ZUR OLIGODYNAMIE BEI DEN PYRIDIN-, CHINOLIN- UND AKRIDINABKÖMMLINGEN

Dr. med. *Otto Ornstein.*

(Eingegangen bei der Redaktion am 6. Juni 1912).

Da Reaktionsverschiebungen bei der Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf metallisches Kupfer den Oxydationsprozess nach Spiro (1) nicht wesentlich beeinflussen, so wird man annehmen müssen, dass die Aufnahme der durch Oxydation und weitere Umsetzung mit Kohlensäure, Schwefelwasserstoff u. a. entstehenden, in Wasser unlöslichen, in Ammoniak, Aminosäuren, Peptonen, Eiweiss und Lipoiden aber löslichen Kuperverbindungen und deren von der Wasserstoffionenkonzentration abhängige Wirkung vorwiegend eine Funktion der Keimmembranen darstellt. Sowohl zwischen verschiedenen Gruppen von Keimen wie auch zwischen Keimen der gleichen Kultur bzw. verschiedenen Alters bestehen bekanntlich erhebliche Gradunterschiede spezifischer und unspezifischer Resistenz. Im Sinne einer Veränderung des Quellungszustandes der Keimmembranen können wie die Wasserstoffionen auch geringe Veränderungen im Elektrolytgehalt der Lösungsmittels durch Förderung oder Hemmung des Austausches zwischen Zellen und Lösung wirken und damit die Adsorption bzw. den Durchtritt keimtötender Substanzen und deren chemische Bindung fördern oder hemmen.

Die Halogene haben nun durch ihre Affinität zu den Aminogruppen des Eiweisses und seiner Bausteine und die da-

durch bedingte Bildung von Chloraminen ihren Angriffspunkt im gleichen Gebiete, in welchem wie eben erörtert die unlöslichen Kupfer- und wohl auch andere Metallverbindungen (Silber u. a.) ihre Adsorptions- und Lösungsbedingungen finden. Bei gleichzeitigem Angriffe von Chlor oder Jod und Metallsalzen hatte aber gerade deren Kombination zu starken Hemmungen der reinen Einzelwirkungen der genannten Stoffe und erst mit geeigneter Reaktion des Milieus zu breiten Zonen starker Wirkung geführt. Diese kombinierte Wirkung war an sich, wie in der Besprechung der Chlorversuche (a. a. O. (2)) erörtert, zunächst wegen der verschiedenen pH-Optima der Halogene und der genannten Metalle nicht zu erwarten, muss aber wegen der Wirkungsförderung der Halogene und des Silbers wie auch des Kupfers in alkalischer Lösung als mehr oder weniger allgemeine Funktion junger vegetativer Kulturen (Staphylokokken, Paratyphus-B-Bazillen) angesehen werden, welche hier zur Prüfung verwendet wurden. Ob die in zahlreichen Versuchen zur Kombination von Desinfektionsmitteln nachgewiesenen, alkalischen Optima bei älteren Kulturen Verschiebungen nach der sauren Seite hin aufweisen, dürfte noch weiter systematisch zu verfolgen sein. Ich verweise dabei auf meine Beobachtungen über die Umkehrung der Kochsalzwirkung nach der Seite zunehmender  $[H^+]$  bei der Verwendung alter Kulturen von Staphylokokken (3).

Der kombinierten Wirkung der Halogene und der genannten Schwermetalle (und zwar deren Chloride, Sulfate, Phosphate) würden nach den vorliegenden Versuchen auch die Wirkung des Kochsalzes bzw. der Chloride der Alkali- und Erdalkalimetalle, des Aluminiums u. a. anzureihen sein. Kochsalz wirkt z. b. bei schwach alkalischer Reaktion stark keimwidrig und verstärkt, wie gezeigt werden konnte, die oben genannten Kombinationen mächtig (z. B.  $J_2$  bzw.  $Cl_2 + CuCl_2$  bzw.  $Ag_2SO_4$ ).

Die Ladungsfähigkeit, der Ladungs- und Quellungs Zustand der Keimmembranen (Plasmahaut) entscheiden also darüber, bei welcher Wasserstoffionenkonzentration die Zellwand die dargebotenen Ionen und Moleküle aufnimmt und chemisch bindet. Die Wirkungsoptimen der verschiedenen wirksamen Stoffe sind bei den gewählten Versuchsbedingungen in Grenzwerten (1. Phase) ziemlich fixiert;

in den höchsten »oligodynamisch« wirksamen Verdünnungen (2. u. U. 3. Phase) sind es aber eigentlich nicht mehr die einzelnen genannten Stoffe wie Halogene, Metallsalze, Neutralsalze, u. a. bzw. deren Ionen, sondern deren Gesamtheit, d. h. die Kombination derselben, welche zur Wirkung kommt.

Unter dieser Vorstellung werden, wie ich schon in früheren Arbeiten darzulegen versucht habe, auch Probleme der inneren Desinfektion verständlicher. Wenn z. B. bezüglich mancher Chemotherapeutica immer wieder festgestellt wird, dass sie in vitro nur in geringem Masse oder spät wirksam oder praktisch unwirksam sind, sich vielmehr erst im Tierversuch oder am kranken Menschen als wirksam erweisen, so kann es sich dabei um mehr oder weniger spezifische Leistungen der betreffenden Stoffe handeln wie bei den Derivaten des Hydrochinin, den Akridiniumverbindungen, dem Salvarsan u. a., oder auch um allgemeinere, weitgehend unspezifische Wirkungen, wie sie neuerdings an sulfanierten Pyridinverbindungen beobachtet wurden. Von diesen berichtet G. Domagk (4): »Über den Wirkungsmechanismus der neuen chemotherapeutischen Mittel sind die Ansichten geteilt. Nach unseren experimentellen Ergebnissen dürfte die erste Phase stets in einem direkten Angriffe auf die Keime zu sehen sein, aber nur selten werden die Bakterien völlig abgetötet, sondern nur soweit verändert, dass sie durch die natürlichen Abwehrkräfte des Körpers einer völligen Vernichtung zugänglich gemacht werden; z. B. verhalten sich nach der Behandlung mit Prontosil die virulenten Streptokokken wie avirulente und werden von den Phagozyten, Leukozyten und Monozyten angegriffen.« Dies Verhalten des Prontosil gegen Streptokokken weist wesentliche Merkmale des Virulenzsturzes auf, welchen Morgenroth und seine Mitarbeiter (5) als Funktion der Depressionsimmunität bei Mäusen gegen Streptokokken und weiterhin als Wirkung der höheren Homologen des Hydrochinins sowie der Akridiniumverbindungen gegen Pneumo-, Strepto-, Staphylokokken zuerst als reproduzierbaren Versuch zur experimentellen Pathologie der inneren Desinfektion mitgeteilt haben. Alle diese Stoffe lassen — von spezifischen Wirkungen abgesehen — mehr oder weniger langsam eintretende und keineswegs sehr hohe Wirkungswerte in vitro feststellen, insbesondere, wenn man statt des Suspensionsversuche den Keimträgerversuch zur Prüfung heranzieht. Trypaflavin und Rivanol erweisen sich nach Hailer bei Ausschaltung der Entwicklungshemmung durch die Keimträgermethode in der Wirkung auf Staphylokokken als sehr schwach (6). Ich selbst fand die Akridiniumverbindungen, »vor allem Rivanol, in sauren bis neutralen, wässrigen Lösungen an sich praktisch wirkungslos, durch Alkali und Salz überhaupt erst in ihrer Wirkung entfaltet und gefördert, ....

und in den Lösungsverhältnissen des normalen Blutes für die Aktivierung einer hohen Wirkung zureichende Bedingungen« (7). In einem verglichenen Desinfektions- und Infektionsversuch liess sich bei genauer Keimzählung auch der Virulenzsturz als Kombinationswirkung demonstrieren. Man wird wohl annehmen dürfen, dass es sich auch bei den neuen Sulfonamidverbindungen der Pyridinreihe mit ihrer erprobten, unspezifischen Wirkungsbreite um ähnliche Kombinationsmechanismen handelt, wie sie hier kurz für frühere, vielleicht vielfach zu früh verlassene oder aufgegebene Chemotherapeutica angedeutet wurden.

Gegen diese Annahme würde auch die von Domagk vermutete Wahrscheinlichkeit nicht sprechen, »dass bei manchen der am lebenden Tiere gut wirksamen Substanzen die wirksamen Komponenten erst im Tierkörper entstehen, vielleicht sogar nur in den Entzündungszellen oder gar an den Bakterien, wenn sie sich unter optimalen Lebensbedingungen im tierischen oder menschlichen Organismus befinden. Dadurch (fährt Domagk fort) würde sich vielleicht auch die besondere spezifische Wirkung einiger in vitro fast unwirksamer Substanzen erklären, bei denen der grösste Teil des Makroorganismus wieder unverändert hauptsächlich im Harn verlässt. Für die Ansicht von der Entstehung besonders wirksamer Substanzen im Tierkörper, resp. seine entscheidende Mitwirkung sprechen eine Reihe von Beobachtungen:«, dass nämlich stundenlang in vitro mit p-Aminophenylsulfonamid oder Prontosil in Konzentrationen, wie sie im Blut oder den Geweben des Organismus niemals auftreten, behandelte Kokken noch zur Ausbildung einer Phlegmone oder zur Infektion führen können, dass ferner die intraperitoneale Zuführung von Prontosil bei i. p. infizierten Tieren nicht besser, sondern meist schlechter wirkt als die intramuskuläre, subkutane oder orale Verabreichung.

Dass verhältnismässig konzentrierten Lösungen von Chemotherapeutica unter verschiedenen Bedingungen in vitro und in vivo ausgesetzte Keime noch nach längerer Einwirkungszeit infektionstüchtig waren, ist auch bei anderen mehr oder weniger spezifisch wirksamen Stoffen beschrieben worden. Ich verweise dafür auf meine oben erwähnten Versuche mit Rivanol und auf das eigentümliche Verhalten des Aluminiums, welches erst bei Gammawerten wirkt (7) (2). Dass zur Erzielung optimaler, keimtötender Wirkungen, besonders bei den Bedingungen der inneren Desinfektion, mehr oder weniger hohe Verdünnungen notwendig sind, ist auch mehrfach beschrie-

ben worden, von Kroò z. B. für Salvarsan bei der Recurrens der Maus (8). Es ist dabei ganz besonders an die stark ei-weissfällende Wirkung der Chinolin- und Akridinderivate in deren höheren Konzentrationen, ebenso des Salvarsans zu denken. Manche Beobachtungen von Domagk über die Ungunst lokaler Applikation von Sulfonamiden, ferner die starken, breiten Hemmungszonen bei den Chinolinen und anscheinend ganz besonders bei den Pyridinen, welche an die Wirkung des Aluminiums erinnern (siehe Tabelle 71 und a. a. O. (2)) sprechen im gleichen Sinne der Wirkungseinschränkung bei Kolloidfällung und Komplexbildung. Auf die Kupfersalze und ihre grosse Neigung zur Komplexbildung mit Ammoniak, Aminen, Aminosäuren und höhermolekularen, organischen Verbindungen mit OH-Gruppen, sowie zur Selbstkomplexbildung besonders des  $\text{CuCl}_2$  und  $\text{CuSO}_4$  in höheren Konzentrationen, wobei die Cupriionenkonzentration mehr oder weniger stark herabgesetzt wird, haben auf Grund der neueren physikalisch-chemischen Entdeckungen von Hittorf, Arrhenius, Palmér, Nernst u. a. besonders Abegg und Kohl-schütter, auf die aus diesem Verhalten des Kupfers (und anderer Metalle) folgende Bedeutung der Verdünnung der Lösungen für die Oligodynamie des Kupfers besonders K. Spiro hingewiesen. Auf wahrscheinlich analoge, biochemische Phaenomene der Antigen-Antikörperbeziehungen, welche nur unter optimalen Quantenverhältnissen in Glas- und Tierversuch reproduzierbar erscheinen, sei nur verwiesen, das Neisser-Wechsberg'sche Phaenomen, die Konkurrenz der Antigene und die eigenartigen Beziehungen zwischen mittleren Antigenquanten und Immunisierungserfolg, wie sie von Killian bei der Pneumokokkenimmunität der Maus beschrieben worden sind (9).

Die von Domagk angenommene entscheidende Mitwirkung des Organismus bei der Wirkung der Sulfonamide, mögen diese nun im ganzen Molekül oder in Teilen wirken, wirft also schliesslich die Frage auf, ob man bei diesen Verbindungen nicht ebenso wie bei den jetzt und früher von mir untersuchten anorganischen und organischen Körpern mit kombi-



nierten Wirkungsmechanismen zu rechnen hat, bei welchen letzten Endes ausserordentlich geringe, an sich mehr oder weniger unwirksame und erst mit der unspezifischen Abwehrbereitschaft in Blut und Lymphe zu hoher Dauerwirkung befähigte Mengen der wirksamen Körper in Aktion treten, wie wir sie aus den Gegebenheiten der oligodynamischen Reaktion auch für die spezifische Immunität mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen berechtigt sind.

Diese Fragestellung ist um so berechtigter, als zu gleicher Zeit mit der zitierten Mitteilung Domagks eine ganze Reihe von Autoren u. zw. an gleicher Stelle, das Wort zum Mechanismus der Sulfonamidverbindungen ergriffen haben.

So kommt *Hammerschmidt* (10) in seiner Untersuchung über die Wirkungsweise des Prontosils zur Anschauung einer rein humoralen Abwehr unter der Einwirkung des Mittels auf den Infekt, bei Fehlen einer Phagozytose. *Schlossberger* und *Bär* sehen auf Grund ihrer Versuche über die Wirkungsweise der Sulfanilamidverbindungen bei der Infektion von Mäusen mit Streptokokken und mit Lymphogranuloma inguinale (11) nur eine vorübergehende Schädigung der Infekte durch diese Mittel, Heilung dagegen erst durch Abwehrmassnahmen des Organismus. Die Tiere erweisen sich dabei teilweise als immun gegen eine Nachinfektion, erkranken und sterben teilweise verspätet, andere zeigen überhaupt keine Anzeichen der Immunität.

Nach dem Gesagten dürfte es sich verlohnen, zu untersuchen, ob nicht schon in vitro an geeigneten Keimen stark bakterizide Wirkungen auch mit Sulfonamiden zur Darstellung gebracht werden können, wie sie im Tierversuch und am Menschen eine so einzigartige Wirkung bewährt haben. Ich lasse diesen Versuchen an Pyridinverbindungen, welche noch nicht abgeschlossen sind, einige alte, nicht veröffentlichte Protokolle über eine Reihe von Chinolinverbindungen vorausgehen, welche überaus charakteristische Wirkungskurven darbieten und es verständlich machen, dass man auf Grund früherer Glasversuche keine rechte Vorstellung über den Wirkungsgrad der betreffenden Mittel gewinnen konnte. Wegen

der Technik der Vitroversuche und der Tabellenlesung verweise ich auf die beiden früheren Mitteilungen in dieser Zeitschrift (2, 3). Diese Glasversuche wären natürlich noch durch Tierversuche zu ergänzen, um sich eine Vorstellung über die Art der Keimschädigung durch die erwähnten Pyridin- und Chinolinderivate machen zu können. Es würde sich dabei zunächst um vergleichende Keimzählungs- und Infektionsversuche handeln, aus welchen hervorgehen müsste, wie weit etwa Keimabnahme in der Kultur einer Virulenzveränderung der Kultur im Tierversuch entspricht; und es würde sich dabei zeigen, ob nicht etwa trotz einer mangelnden bakteriziden Wirkung Abnahme der Virulenz vorlag. Einen solchen Versuch mit Rivanol, welcher das letztere Verhalten gut zur Anschauung bringt, entnehme ich einer alten Arbeit (7) und schalte ihn an geeigneter Stelle ein.

Wie sich aus *Tabelle 1* ergibt, sind annähernd neutralen Eiweiss- bzw. Ringereiweisslösungen (nach Ringer besalzene Lösungen elektrolytfreien Albumin-Globulingemisches vom Pferd (7, S. 339) Ringereiweisslösungen variierter pH gegenübergestellt und zeigen, ohne dass ein Eingehen auf die einzelnen Körper benötigt würde, einige wesentliche Merkmale ihrer Wirkung:

- 1) Wirkungshemmung bei 1:1000 bzw. 1:3000,
- 2) absolute bzw. relative Wirkung zwischen 1:1000 bis 1:100000 bzw. 1:1000000,
- 3) Zunahme der Wirkung mit alkalischer Reaktion,
- 4) leichte Herabsetzung der Wirkung durch Besalzung und Pufferung.

Diese Versuche zeigen also verhältnismässig gute, absolute Wirkungszonen in eiweisshaltiger (3 %) Lösung, ebenso in den meisten Fällen in Gegenwart von Ringersalzen; etwas schlechtere bei Gegenwart von Phosphaten in Ringereiweisslösung. Die Wirkungszone liegt im Bereiche höherer Verdünnungen zwischen 1:1000 und 1:300000 bis 1:1000000.

Die »reine Wirkung« dieser Stoffe (in wässriger Lösung ohne sonstige Zusätze) ist meistens schlecht: So wirkte salicylsaures Oxychinolin ebenso wie sulfosalicylsaures Oxy-

Tabelle 1.

Verschiedene Oxychinolinderivate in Ringereiweiss bei fallenden  $pH$   
(m/60 Phosphatpuffer) geprüft gegen Staphylokokken; nach 24 Stunden  
den Einwirkung: Auszählung.

Konzentration:

1:1000 : 3000 : 10000 : 30000 : 100000 : 300000 : Mill.

 $pH$ -K. Einsaat

(000)

*Salicylsaures Oxychinolin:*

	6.3 $pH$	7.0 "	7.6 "	7.0 "	7.0 "
Ringereiweiss	650	286	247	494	4329
mit m/60	6199	234	390	455	2808
" Ph.-Puffer	3149	195	416	975	715
ohne	494	130	299	390	338
Eiweiss allein	1144	19	2	3	2145
					5850
					5794
					10985
					6799
					12285
					10630
					1394
					6435
					9815
					12870
					13740
					9385
					13714

*Sulfosalicylsaures Oxychinolinnatrium:*

	6.3 $pH$	7.0 "	7.6 "	7.0 "	7.0 "
Ringereiweiss	624	57	19	38	377
mit m/60	403	105	17	221	227
" Ph.-Puffer	384	33	4	97	74
ohne	793	37	2	1	1
Eiweiss allein	676		2	14	169
					442
					2808
					11293
					5850
					7839
					10827
					9457
					9412
					3574
					10227

*Benzoesaures Oxychinolin:*

	6.3 $pH$	7.0 "	7.6 "	7.0 "	7.0 "
Ringereiweiss	3393	546	130	162	620
mit m/60	5967	624	208	286	1001
" Ph.-Puffer	5265	299	351	468	546
ohne	1813	6	13	2	
Eiweiss allein	8892	8	5	1	
					1131
					2708
					8196
					286
					793
					11232
					10998
					9756
					9694
					481
					3342
					11457
					11112
					9170
					10195
					13714

*Benzoesaures Oxychinolinnatrium:*

	6.3 $pH$	7.0 "	7.6 "	7.0 "	7.0 "
Ringereiweiss	377				
mit m/60	1133				
" Ph.-Puffer	2340				
ohne	3978				
Eiweiss allein	114				
					546
					614
					4914
					7290
					7371
					123
					728
					7020
					12935
					754
					16151
					3627
					11807
					6500
					12921
					14268
					16872
					11095
					3342
					16960

*Sulfobenzoesaures Oxychinolinnatrium:*

	6.3 $pH$	7.0 "	7.6 "	7.0 "	7.0 "
Ringereiweiss	130	182	23	390	142
mit m/60	338	23	195	377	8892
" Ph.-Puffer	35	12	182	598	416
ohne	64	5		5	3
Eiweiss allein	8			1	5
					4329
					7964
					12402
					11922
					234
					10296
					6786
					11317
					10715
					11718
					5911
					8541
					11460
					11940
					12113
					11794

Tabelle 1 (Fortsetzung).

Konzentration:		1:100	:300	:1000	:3000	:10000	:30000	:100000	pH-K.	Einsatz
<i>Orthooxychinolinsulfonsaures Kalium:</i>										(000)
Ringereiweiss	6.3 p <sub>H</sub>	48	3978	572	195	.	.	35	4329	10189
mit m/60	7.0 »	.	3042	272	.	.	.	21	10270	
» Ph.-Puffer	7.6 »	.	3895	405	.	.	.	6	7930	
ohne »	7.0 »	.	3731	715	.	.	.	.	3710	
Eiweiss allein	7.0 »	.	2262	780	.	.	.	.	325	

(Die Verdünnungen des zuletzt untersuchten Chinolinderivats (Chinosol) sind von 1:100 bis 1:100000 abgestuft. Überall ist der zweiphasige Wirkungstypus ausgesprochen. Die m/60 Phosphatpuffer wirken ebenso wie die Ringsalze kaum hemmend.)

chinolinnatrium nur bis 1:30000 u. zw. bei nur relativer Keimverminderung; benzoesaures Oxychinolin nur bis 1:3000 und von 1:300000 ab; benzoesaures Oxychinolinnatrium bis 1:1000 und von 1:100000(?) ab, beide Verbindungen in den höheren Verdünnungen nur bei relativer Keimverminderung; am besten wirkte noch sulfobenzoesaures Oxychinolinnatrium bis 1:1000 und von 1:100000(?) ab. Diese Stoffe wirkten also, soweit sie in genügend hohen Verdünnungen geprüft wurden, in zwei Wirkungszonen; absolut in hohen Konzentrationen bis etwa 1:3000; relativ etwa bis 1:30000, aber auch noch wieder in sehr hohen Verdünnungen von 1:100000 bis 1:1000000.

Die relativ schwache, auf zwei Zonen verteilte Wirkung der Chinolinderivate ist also in alkalischer Ringereiweisslösung auf eine durchgehende, mehr oder weniger absolute Wirkungszone ausgeweitet. Besonders eindrucksvoll erwies sich dieses Verhalten an zwei Chinosolpräparaten (Orthooxychinolinsulfonsaures Kalium), wie sich aus *Tabelle 1* ergibt. Beide Präparate wirkten gleich gut unter den gegebenen Bedingungen, beide in wässriger Lösung gleich schlecht.

Schliesslich stelle ich drei gleichzeitig angestellte Versuche mit Sulfapyridin (Sulfanilamidpyridin?) Astra, Chinosol und Rivanol in wässriger Lösung und bei pH-Grenzwerten in *Versuch 71* zusammen mit einem Kupferversuch aus *Versuch 72*: Das Ergebnis ist ausserordentlich interessant, indem der

## Versuch 71.

Rivanol, Chinosol, Sulfapyridin (Sulfamidpyridin?) Astra in aqua destillata und bei Grenzwerten der H-Ionenkonzentration gegen Staphylokokken (Staph. aur. Åsö 3.), Ansatz wie immer, Einsaat 1/50 Öse entspr. 20 Millionen Keime, Aussaat 1/1000 der Einsaat, also etwa 20000 Keime, nach 48 Stunden:

Rivanol:	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{100000}$	$\frac{1}{1000000}$	$\frac{1}{10000000}$	aqu.
aqu.	—	—	$\pm 100$	$\pm 40$	$\pm 200$	2
6.6	—	—	—	$\pm$	2	3
8.0	—	—	—	$\pm 100$	$\pm$	2
n/10 NaCl	—	—	—	$\pm$	$\pm$	1
6.6	—	—	$\pm 45$	$\pm$	$\pm$	3
8.0	—	—	—	—	$\pm 27$	1

## Chinosol:

aqu.	—	—	—	—	—	2
6.6	$\pm$	3	3	—	—	3
8.0	1	3	3	—	—	1
n/10 NaCl	—	$\pm 200$	$\pm 80$	—	—	2
6.6	$\pm$	3	1	—	$\pm$	2
8.0	1	3	2	—	—	$\pm$

## Sulfapyridin:

aqu.	$\pm 75$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	1
6.6	1	$\pm 80$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	2
8.0	$\pm$	$\pm 60$	$\pm 43$	$\pm 38$	$\pm 30$	$\pm$
n/10 NaCl	$\pm$	1	1	$\pm$	1	2
6.6	3	2	1	1	$\pm$	2
8.0	$\pm$	$\pm 150$	$\pm 100$	$\pm 75$	$\pm 100$	1

Beachte die zweiphasige Wirkung des Chinosol und des Sulfapyridin, worin sie den Schwermetallen gleichen! Als Beispiel ist  $\text{CuCl}_2$  darunter aufgeführt. In schwach alkalischer Lösung verstärken Rivanol, Chinosol und Sulfapyridin wie Kupfer oder Silber ihre Wirkung und werden durch Kochsalz darin noch gesteigert, oder wenigstens (Sulfapyridin) nicht wesentlich eingeschränkt. Selbstkomplexbildung, bes. bei Chinosol und Sulfapyridin! Wie bei Kupfer und besonders Aluminium und Kiesel (2).

## Versuch 71 (Fortsetzung).

$\text{CuCl}_2$	$\frac{n}{100}$	$\frac{n}{1000}$	$\frac{n}{10000}$	$\frac{n}{100000}$	$\frac{n}{1000000}$	$\frac{n}{10 \text{ Mhl.}}$	$\frac{n}{100 \text{ Mhl.}}$	aqu.
aqu.	—	—	$\pm 200$	—	$\pm$	1	2	2
5.9	—	—	$\pm$	1	2	2	2	4
6.6	—	$\pm 50$	$\pm 100$	$\pm$	2	3	3	3
7.3	$\pm$	$\pm$	$\pm$	1	2	3	3	4
8.0	—	—	—	$\pm 100$	1	1	2	4

Pyridinabkömmling zwar durchweg Hemmungen zeigt, aber ebenso deutlich zweiphasige Wirkung, in saurem Mittel Verstärkung der Hemmung, in alkalischem Steigerung der Wirkung gegenüber der wässrigen Lösung, und zwar auch bei Gegenwart von Kochsalz aufweist. Chinosol bietet in gepufferten und in gepufferten und besalzenen Lösungen die aus den alten Tabellen bekannten breiten Hemmungszonen zwischen 1:1000 und 1:Millionstel dar, um von da ab besonders bei alkalischer Reaktion zu breiter Wirkung zu gelangen, deren Grenze in dem vorliegenden Versuche nicht erreicht erscheint. Rivanol schliesslich zeigt bei nur angedeuteter Zweiphasigkeit deutliche Verstärkung durch Kochsalz und zwar besonders bei alkalischer Reaktion. Kupferchlorid ist wie die genannten Stoffe zweiphasig, die Verstärkung durch Alkali (Phosphatpuffer) ist nur eine bedingte. Erst durch Kombination mit anderen Salzen (wie Kochsalz, Aluminiumchlorid u. a.), Halogenen u. a. wird eine additive, oligodynamische Wirkung erreicht (2).

Es dürfte kaum der Mühe lohnen, an Hand so weniger Versuche über den Mechanismus der Wirkung der genannten Stoffe mit Rücksicht auf deren Bau auch nur Vermutungen auszusprechen. Da aber die Merkmale der Mehrphasigkeit und der Abhängigkeit von einer den physiologischen Verhältnissen angenäherten Reaktion, bei Verstärkung durch bzw. bei weitgehender Indifferenz gegen Besalzung, gegeben erscheinen, so

dürfte die weitere Frage besonders der Bearbeitung wert sein, in welcher Beziehung bei den Pyridin-, Chinolin- und Akridin-abkömmlingen die Komplex- und Selbstkomplexbildung zur Wirkung steht, und ob sich daraus Vermutungen bzw. experimentelle Fragestellungen über die Spezifität der genannten Körper und deren Derivate ergeben. Die oben genannten Merkmale legen jedenfalls nach dem Verhalten dieser cyklischen Verbindungen in vitro nahe, dass diese, wie ich schon oben für die früher untersuchten Akridiniumverbindungen citiert habe, »in den Lösungsverhältnissen des normalen Blutes für die Aktivierung einer hohen Wirkung zureichende Bedingungen« finden müssen. Welcher Art diese Wirkungen sind, dürfte sich zunächst ganz roh aus vergleichenden Keimzählungs- und Infektionsversuchen, wie ich einen solchen hier mitteile, ergeben (7, S. 367):

Vergleichende Prüfung der abtötenden Wirkung von Rivanol auf Streptokokken durch den Kultur- und Tierversuch unter Berücksichtigung verschiedener Lösungsmittel und der Einwirkungszeit des in denselben gelösten Desinfektionsmittels:

Rivanollösung (1 : 100000) Zeit d. Entnahme n. Beimpfg. m. Streptokokken	in physiologischer NaCl- Lösung.		in physiologischer NaCl- Lösung. entspr. n/100 NaOH	
	Keimzahl	Virulenz b. Mäusen	Keimzahl	Virulenz b. Mäusen
1 Min.	1200000	† n. 26 Std.	900000	† n. 46 Std.
4 »	1200000	† n. 50 »	900000	† n. 40 »
16 »	1000000	† n. 40 » n. 40 Std.	700000	munter lebt.
60 »	600000	schwer krk., n. 5 Tg. erholt.	200	» »
240 »	500	munter lebt.	.	» »

Ergebnis: Verstärkung des Virulenzsturzes bei Streptokokken durch Einwirkung alkalischer statt wässriger Rivanollösung.

### *Zusammenfassung.*

An einer Reihe von Chinolinderivaten, insbesondere an Chinosol (Orthooxychnilinsulfonsaures Kalium), sowie an dem Akridinderivat Rivanol und dem Akridinabkömmling Sulphapyridin (Sulfanilamidpyridin?) werden die Aktivitätskurven untersucht. Dabei wird dargetan, dass ungeachtet der mangelhaften sogenannten reinen Wirkung in Wasser, alle diese Pyridin-, Chinolin- und Akridinabkömmlinge zweiphasige Wirkung aufweisen, in saurem Mittel gehemmt, in alkalischem dagegen zu breiten Wirkungszonen verstärkt und durch die Elektrolyte des Blutes und durch dessen Puffer, insbesondere durch Eiweiss (neutrales Albumin-Globulingemisch), soweit geprüft, nur wenig eingeschränkt, z. T. sogar (Sulfanilamidpyridin, Chinosol, Rivanol) noch gefördert werden.

Einige experimentelle Gesichtspunkte zur Frage der Beziehung zwischen Komplexbildung und Wirkung werden aufgeworfen; ebenso zur Frage der Aktivierung dieser zyklischen Verbindungen zu oligodynamischer Wirkung unter den Lösungsbedingungen im Organismus. Auf die Analogie der Wirkung dieser Körper *in vitro* mit gewissen Schwermetallen (Kupfer, Silber) und insbesondere mit Aluminium und Kiesel wird hingewiesen.

### LITTERATUR.

- 1) K. Spiro: Münchener Medizinische Wochenschrift, S. 1601, 1915.
- 2) O. Ornstein: Experimentelle Beiträge zur oligodynamischen Wirkung; im Druck Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica.
- 3) — Die Beziehung der  $[H\cdot]$  zur Desinfektionswirkung u. a., ebenda XVII, 286, 1940.
- 4) G. Domagk: Zentralblatt f. Bakt. Orig. I. 144, 206, 1939.
- 5) J. Morgenroth, H. Biberstein und R. Schnitzer: Deutsche Medizinische Woch. Nr. 13, 1920.
- 6) E. Hailer: Weyls Handbuch der Hygiene, VIII, 1922.
- 7) O. Ornstein: Zeitschrift für Hygiene 106, 327, 1926.



- 8) *H. Kroó, F. O. Schulze*: Deutsche Mediz. Woch. Nr. 42, 1927.
- 9) *H. Killian*: Zeitschrift f. Hygiene. Bd. 104, 1924.
- 10) *Hammerschmidt*: Zentralblatt f. Bakt. Orig. I. 144, 443, 1939.
- 11) *Schlossberger und Bär*: Ebenda 144, 228, 1939.

Abgeschlossen: Stockholm, im Juni 1941.

## HISTOLOGICAL CHANGES IN THE KIDNEYS IN FAT-EMBOLISM

By *Erik Waaler*, M. D.

(Received for publication Juni 12th 1942.)

In routine post mortem examinations of cases of fat-embolism the main interest, as a rule, is confined to the demonstration of the fat emboli in the capillaries of the lungs, heart, brain and kidneys in frozen sections stained by one of the special fat stains. It is well known, however, that the emboli can produce morphological changes in the various organs. These secondary changes are probably more pronounced in the central nervous system than elsewhere, and the marked parenchymatous changes in the brain have been very thoroughly studied in the later years by the aid of modern neurohistological methods. The changes in the other organs are inconsiderable and have not been so thoroughly examined.

In his monograph from 1911, Backer Grondahl (1) describes the small histological changes in the various organs. In the kidneys he found a slight degeneration of the tubular epithelium. The glomerular capillaries contained the fat emboli, and in a few instances serous exudate was found in the glomerular spaces. As a rule the urine was normal, and the renal function was not impaired, although a slight oliguria some times has been observed. In experimental fat embolism, on the other hand, anuria may occur.

We have in our laboratory observed a case of fat-embolism with marked and peculiar histological changes in the kidneys,

and believe that these changes are due to the fat emboli. So far as we can see similar changes are not previously described.

The patient E. L. was a 49 years old man. He was admitted to Telemark Hospital on the 26th of october 1940 with a comminute fracture of his right leg. On the following day he had a slight rise in temperature ( $38^{\circ}$  C), and became drowsy. The second day (28th of october) he had marked dyspnea and a foamy sputum. The two following days he became gradually unconscious, and he died in coma the 4th day (30th of october). The urine was normal on the day of admission, but was later not examined.

Autopsy was carried out the same day and the lungs, brain and the kidneys were sent to the Pathological Institute for microscopic study. Fat emboli were found in large amounts in the capillaries of the three organs. The brain showed in addition to punctiform hemorrhages marked parenchymatous changes which will be thoroughly studied by dr. Cammermeyer. In this paper only the changes in the kidneys will be dealt with.

1. Frozen section stained by Sudan. In the glomeruli numerous globules and cylinders of fat are found. As a rule not more than 6—8 fat droplets are seen in one glomerulus, and in some there is none. The renal tubules does not show any fatty degeneration.

2. Hematoxylin Eosin, (*Fig. 1*). In paraffin sections stained by H. and E., many glomeruli contain an eosinophilic rather homogenous material appearing as red cylinders and globules. As a rule the capillary loops are completely filled by these eosinophilic deposits, but in some places a few red blood corpuscles are found in the center or adhering to the periphery. Their number varies from the one glomerulus to the other. Usually there is not more than 10, and in some there is none. The epithelial cells of the glomeruli and the capillary endothelium does not show any proliferation, and there is no exudate in the glomerular spaces. The cells of the tubuli show a slight post mortem autolysis, and there is no definite signs of degeneration.

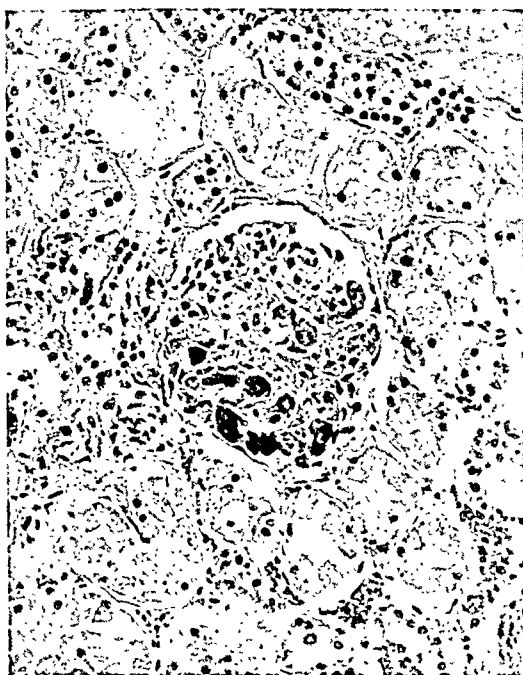


*Fig. 2.*

Drawing. Frozen-section. Sudan-Ironhematoxylin. The hyaline thrombi and the fat emboli are seen side by side.



These eosinophilic deposits are very much like the hyaline thrombi which can be found in the glomeruli in subacute bacterial endocarditis and the hyaline thrombi observed in acute nephritis by MacCallum (2). The material is stained blue by Weigerts fibrin stain, and red by Mallorys connective tis-



*Fig. 4.*

Photomicrograph. The hyaline deposits in the glomeruli are seen.  
Hematoxylin-Eosin stain.

sue stain. According to the histological staining reactions, therefore, it should be correct to regard the eosinophilic material as fibrin thrombi.

In order to demonstrate the relationship between the fat emboli and the fibrin thrombi, frozen sections were stained by Sudan counterstained by Ironhematoxylin (*Fig. 2*). The thrombi appeared as dark black masses, even darker and

more intensely stained than the nuclei. There is a marked contrast between the fat droplets and the fibrin thrombi. Some glomeruli contain only the emboli, others only the thrombi, but in most places, both of them are present. In some glomeruli the thrombi and emboli are found wide apart, but in many they are found side by side.

There is reason to believe that the formation of these fibrin thrombi in some way depends upon the fat emboli. The most likely explanation is that they are caused by the mechanical blockade of the capillary loops, but it can not be excluded that some functional disturbance, as for instance true stasis, may play a role. As demonstrated in the sections stained by Sudan and Ironhematoxylin some glomeruli contained only fat, others only thrombi. This non-conformity in the distribution may give support to the supposition of a functional etiology of the thrombi. Several circumstances, however, can explain this apparent non-concordance in the distribution of the emboli and thrombi. Some emboli may have occurred so late that there has been no time for the development of the thrombi. Secondly the explanation may be that some emboli may become loosened, after having first occluded the vessel and caused the production of the thrombi. The incongruity in the distribution of the thrombi and emboli does not, therefore, necessarily mean that the mechanical occlusion of the capillaries is not the cause of the thrombi. The non-conformity, it remains to be said, was not very large. Whether the fibrin thrombi are produced by mechanical influence alone or by functional changes or both can not be decided, but in any case we regard them to be dependent on the fat emboli.

As mentioned above, MacCallum has described hyaline thrombi in the glomeruli in cases of acute nephritis. These hyaline thrombi were, according to the description, very much alike the fibrin deposits observed in this case. The question arises, therefore, whether the changes observed in this case might have been followed by the usual findings in subacute

and chronic nephritis if the patient had lived longer. Some observations by Hagerly (3) lend support to this theory. Hagerly injected emulsified oleic acid, liquid petrolatum and human fat into the renal arteries of dogs and rabbits. The animals were killed on the 10th day and later. Two varieties of lesions were observed, dependent on the chemical composition of the fat. Mild fat irritants caused proliferation of the endothelial cells and minimal growth of connective tissue, whereas strong irritants caused swelling of the endothelial cells and marked production of collagenous tissue. The lesions are in many respects similar to those seen in diffuse glomerulonephritis. As Hagerly did not study the anatomical changes before the 10th day, it is impossible to compare the changes in Hagerly's experiments with those in this case, where probably 2—3 days only had passed since the occurrence of the fat emboli. Hagerly believes that the anatomical changes which he has observed in the glomeruli are due to the irritating effect of the fat and not to the circulatory disturbance following the occlusion of the vessels. It is not unlikely, however, that similar changes may have been present in the glomeruli of Hagerly's animals at an earlier date, as for instance 2—4 days after the introduction of the fat into the renal arteries.

The role and frequency of the changes observed in our case are unknown. As mentioned above we have not found any reports in the literature of similar changes in the kidneys in cases of fat-embolism. As a rule the brain symptoms dominate the clinical picture, and it is therefore reasonable that the clinicians and anatomists have considered the brain more closely, than other organs. It will, however, be of great interest if the clinicians could study the kidney function more closely than usual in cases where fat-embolism can be expected. Not only should the urine be tested for the presence of albumen and blood, but particularly should the diuresis and excretion of urea be controlled.



## Summary.

1. The author reports a case of fat-embolism where the patient died 3 days after the onset of the first clinical symptoms.
2. In addition to the usual fat emboli in the organs peculiar changes were observed in the glomeruli. The glomerular capillaries contained eosinophilic deposits believed to be fibrin thrombi.
3. Most of the glomeruli contained fibrin thrombi and fat emboli either side by side or more wide apart in the same glomerulus. In some glomeruli the thrombi were found alone, in others the fat droplets alone.
4. The relationship between the fat emboli and the thrombi is discussed.
5. It is believed that the fibrin thrombi may have some influence upon the kidney function.

## REFERENCES

1. *Backer Grøndahl, Niels*: Om fettemboli. Kliniske, etiologiske, patologisk-anatomiske, forensiske og eksperimentelle studier. Kristiania, 1911.
2. *MacCallum, W. G.*: Glomerular changes in nephritis. Bull. Johns Hopkins Hosp., 1934, LV, 416.
3. *Hagerty, Cornelius S.*: Experimental embolic glomerulonephritis produced with human fat, fatty acids and calcium soaps. Arch. Path., 1938, 25, 24.

## EIN VEREINFACHTES VERFAHREN ZUR REIN- ZÜCHTUNG VON MUNDSPIROCHÄTEN

Von *Harry S. Klein.*

(Eingegangen bei der Redaktion am 17. Juni 1942).

Bisher liegen weder klinische noch experimentelle Beweise dafür vor, dass die oralen Spirochäten allein Krankheiten beim Menschen hervorrufen können. Dagegen sind die meisten Forscher auf diesem Gebiet darüber einig, dass diese Spirochäten, in Symbiose mit gewissen anderen Mikroorganismen (fusi-formen Bazillen, Vibrionen und Kokken), sowohl akute als chronische Krankheitszustände in der Mundhöhle hervorrufen können. Angina Vincenti sei als Beispiel angeführt. Die Rolle, die die Mundspirochäten bei der Entstehung dieser Krankheitszustände spielen, ist indessen noch ungeklärt. Dass dem so ist, dürfte teils auf der Schwierigkeit beruhen, zu beurteilen, ob die in dem angegriffenen Gewebe nachgewiesenen Mikroorganismen pathogene Wirkung besitzen oder nur sekundär von der normalen Flora der Mundhöhle her dahingelangt sind, teils auf den technischen Schwierigkeiten, welche die Reinzüchtung von Spirochäten darbietet.

Da ich mir die Aufgabe gestellt hatte, zu untersuchen, welche Bedeutung die Mundspirochäten für die Entstehung und Entwicklung der Zahnfleischkrankheiten haben, richtete ich meine Bemühungen zunächst darauf, ein zuverlässiges, einfaches Verfahren zur Reinzüchtung dieser Mikroorganismen zu finden.

Folgende Mundspirochäten sind Gegenstand der Untersuchung gewesen:

- Treponema microdentium* (Noguchi),
- » *macrodentium* (Noguchi),
- » *vincenti* (Blanchard),
- » *buccale* (Cohn, Dobbel).

Ich gebe hier eine kurze Beschreibung dieser Spirochäten, in der Hauptsache nach *Smith*.

*Treponema microdentium* ist eine der kleinsten Spirochäten, die in der Mundhöhle des Menschen vorkommen. Die Länge variiert zwischen 3 und 12  $\mu$  und die Breite zwischen 0,2 und 0,25  $\mu$ . Die Anzahl der Windungen ist je nach der Länge und dem Alter verschieden. Bei jungen Formen beträgt diese Anzahl 4 bis 6, bei älteren bis zu 20. Die Windungen sind regelmässig und scharf markiert. Undulierende Membran und Zilien fehlen (*Dobbel*). Das Zytoplasma enthält Chromatinkörnchen (*Mühlens*). Die Bewegungen sind langsam und bestehen teils in einer Rotation um die eigene Achse, teils in Fortbewegungen in der Längsrichtung, die ebenso leicht nach vorwärts wie nach rückwärts geschehen. Die Teilung erfolgt transversal, einfach oder multipel.

*Treponema macrodentium* ist, wie der Name angibt, grösser als der soeben beschriebene Mikroorganismus und misst an Länge zwischen 4 und 15  $\mu$ , an Breite zwischen 0,3 und 0,45  $\mu$ . Die Windungen sind bedeutend grösser und gröber als bei *microdentium*, die Bewegungen erfolgen beträchtlich rascher, im übrigen aber hat diese Spirochäte dieselben Eigenschaften wie die letztgenannte.

*Treponema vincenti* ist ein klein wenig grösser als *macrodentium*, hat aber sehr unregelmässige Windungen. Die Länge variiert zwischen 5 und 20  $\mu$ , die Breite zwischen 0,3 und 0,5  $\mu$ . Zilien sind nicht vorhanden, die Fortbewegung erfolgt durch rasches, aalähnliches Schlängeln. Die Teilung geschieht transversal, einfach oder multipel.

*Treponema buccale* ist die grösste der Mundspirochäten, mit einer Länge von 3 bis 25  $\mu$  und einer Breite von 0,6 bis 0,8  $\mu$ . Im Dunkelfeldmikroskop gesehen, bewegt sie sich wie ein Regenwurm. Da sie infolge ihrer Dicke doppelkonturiert erscheint, ist sie die am leichtesten zu erkennende der Mundspirochäten. Zilien fehlen, die Teilung erfolgt transversal.

*Mühlens* und *Hartmann* gelang es als ersten, Mundspirochäten reinzuzüchten. Als Substrat verwendeten sie Pferde-

serumgelatine, und der reingezüchtete Mikroorganismus wurde *Spirochaeta dentium* genannt. *Noguchi* stellte in Reinkultur dieselbe Spirochäte dar, die er jedoch *Treponema microdentium* nannte, und ausserdem eine grössere, von ihm als *Treponema macrodentium* bezeichnele. Er benutzte Schafserum, dem kleine Stücke frischer Hoden oder Niere von Schaf oder Kaninchen zugesetzt waren, und das unter Luftabschluss auf 37° C gehalten wurde. Die Einsaat erfolgte durch Stich in das Zentrum einer hohen Agarsäule in einem gewöhnlichen Reagensröhrchen. Auf Grund eigener Versuche muss ich indessen *Smith* beistimmen, wenn er sagt, dass die Methode umständlich und auch unzuverlässig ist. Um eine Reinkultur zu erhalten, muss man nämlich 10 bis 20 Röhren beschicken, da gasbildende Mikroorganismen, die mit in der Mischkultur enthalten sind, oft die Agarsäule zersprengen und dadurch eine Trennung der verschiedenen Mikroben unmöglich machen. Nachdem *Smith* entdeckt hatte, dass die Gasbildner in 50 % der Fälle beseitigt wurden, wenn man das gemischte Material einem Meerschweinchen in die Leisten-gegend einspritzte, ergab *Noguchis* Methode mit dieser Modifikation bessere Resultate. Immer noch bedurfte es jedoch zu einer einzigen Reinkultur oft 10—20 Röhren.

*Smith* verfuhr folgendermassen. 2-proz. Fleischwasseragar, gemischt mit Aszites- oder Pleuraflüssigkeit im Verhältnis 2 : 1, wurde in gewöhnliche Reagensröhrchen bis zu einer Höhe von 6—8 cm gegossen und danach erstarren gelassen. Mit einem Platindraht wurde das Züchtungsmaterial zentral und tief in den Agar eingepflanzt. Drei bis fünf Röhren werden besät, ohne dass das Material erneuert wird: auf diese Weise wird gleichzeitig eine Verdünnung der Saat erhalten. Nach 6—15 Tagen kann man ein dünnes, nebelähnliches Wachstum wahrnehmen, das sich vom zentralen Teil der Säule aus nach der Röhrenwand hin ausbreitet. Ist das Wachstum bis halbwegs zur Wand hin gelangt, ritzt man die Glasröhre mit einer scharfen Feile ringsherum in der Höhe der Mitte der Agarsäule, worauf die Röhre abgebrochen wird. Danach schneidet man mit einem sterilen Messer den oberen Teil der Agarsäule

ab. Den übrigen Teil schüttet man in eine sterile Petrischale. Der Agar wird dann longitudinal in dünne Scheiben geschnitten. Nach einigen wenigen Scheiben findet man das Spirochätenwachstum frei von anderen Bakterienkolonien. Erweist sich das Wachstum bei Untersuchung im Dunkelfeldmikroskop als rein, so werden Sekundärkulturen angelegt. Für diese ist indessen ein Zusatz von Stücken frischen Gewebes notwendig. *Smith* benutzte Stücke von Kaninchenniere.

Die oben beschriebenen Methoden sind natürlich sehr umständlich und zeitraubend und ergeben ausserdem ungleichmässige Resultate. Bessere Resultate sind mit *Fortners* Plattenmethode zur Anaerobzüchtung erzielt worden. *Fortner* selbst ist, wie *Gins* mitteilt, mittels dieser Methode die Reinzüchtung von *Treponema microdentium* gelungen.

Nachdem ich mit den oben angeführten Methoden zu keinem befriedigenden Ergebnis gelangt war, wandte ich mich der *Fortner'schen* Plattenmethode zu. In ihrer ursprünglichen Form ist diese Methode indessen mit gewissen Nachteilen behaftet. So ist es schwierig, diejenige Hälfte des Substrats, die mit *Serratia marcescens* besät wird, von der anderen, für das Untersuchungsmaterial bestimmten Hälfte effektiv zu trennen. Hinüberwachsen von *Serratia* in die letztgenannte Hälfte trifft daher oft ein, entweder dadurch verursacht, dass die beiden Substrathälften miteinander in Berührung kommen, oder dadurch, dass Feuchtigkeit den Transport vermittelt. Optimale Bedingungen für das Spirochätenwachstum schießen auch bei dieser Methode nicht vorzuliegen. So gelang es mir Spirochätenwachstum nur auf etwa jeder zehnten Platte zu erzielen, und ferner war es unmöglich, auf diese Weise eine Sekundärkultur zu erhalten:

Eine von mir vorgenommene, nachstehend beschriebene Modifikation der *Fortnerschen* Methode führte indessen zu besseren Resultaten (Abb. 1—3). In einer kleineren Petrischale mit niedrigem Rand (A), die eine dünne Schicht gewöhnlichen Agar enthielt, wurde *Serratia* ausgesät, worauf die Schale mittels einer Plastilinkugel (B) auf der Glasplatte (C) befestigt wurde. Die grössere Petrischale (D), die ein aus

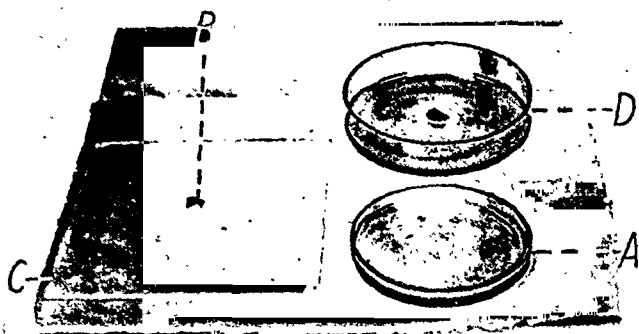


Abb. 1.



Abb. 2.

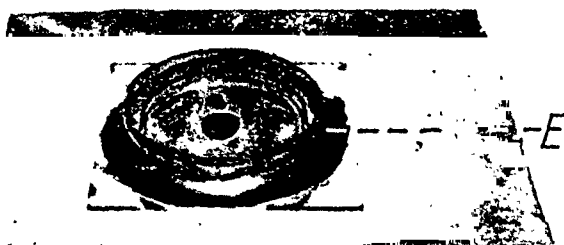


Abb. 3.

Abb. 1—3.

Zur Veranschaulichung der hier beschriebenen Modifikation  
der Fortnerschen Methode.

2 Teilen 2-proz. Agar + 1 Teil Bouillon + 1 Teil inaktiviertem Pferdeserum bestehendes Substrat enthielt, konnte nun in ihrer Gesamtheit mit dem Primärmaterial besät werden, worauf sie mit der Substratoberfläche nach unten über die kleinere Schale auf der Glasplatte gestellt wurde. Danach wurde mit Plastilin gedichtet (E). Die Inkubation erfolgte in Thermostat bei 37° zwei Tage lang, danach bei 30°. Nun ging es bedeutend leichter, aus Material von Zahnfleischtaschen her Spirochäten zum Wachsen an der Oberfläche zu bringen, aber sie kamen zumeist in Mischkulturen vor und entwickelten sich andauernd nicht auf Sekundärplatten.

Im Hinblick darauf, dass die Mundspirochäten am besten in Zahnfleischtaschen und in Schleimhautrissen gedeihen, machte ich nun mit demselben Ursprungsmaterial eine tiefe Aussaat in das Substrat, so dass gewissermassen eine künstliche Tasche gebildet wurde. Im übrigen wurde wie oben verfahren. Das Ergebnis war, dass nach 24 Stunden bei 37° Wachstum auf so gut wie jeder Platte vorhanden war, teils ein Oberflächenwachstum, das sich im Dunkelfeldmikroskop als eine auch Spirochäten enthaltende Mischkultur erwies, teils ein Wachstum im Innern des Substrats.

Das Wachstum im Substrat hatte ein sehr charakteristisches Aussehen. Schon nach 24 Stunden war ein von übrigen Wachstum scharf abgegrenzter, horizontal wachsender Ring von etwa 3 mm Durchmesser wahrzunehmen. Ein 0,5 mm breiter Rand hatte weisse, opake Farbe, während das Wachstum innerhalb des Kreises einen mehr nebelartigen, durchscheinenden Charakter aufwies. Der Durchmesser nahm anfangs ungefähr um 2 mm pro Tag zu, nach dem sechsten und siebenten Tage um 3 mm in 24 Stunden (siehe Abb. 4). Am achten Tage begann der opake äussere Randstreifen allmählich zu verschwinden, und das Wachstum bot nun ein Aussehen dar wie in Abb. 5. Die inneren Ringe in Abb. 5 und ebenso in Abb. 6 bestehen aus Mischwachstum in anderen Schichten des Substrats, welches Wachstum sich langsamer entwickelt. Konzentrischer Wuchs bildet im allgemei-



Abb. 4.

nen die Regel, dass aber Ausnahmen vorkommen, geht aus Abb. 6 hervor.

Nimmt man die Oberflächenschicht weg und untersucht dann Proben vom Rande des Wachstums im Dunkelfeldmikroskop, so findet man vereinzelte, lebhaft bewegliche Spirochäten, während weiter nach dem Zentrum hin entnommene Proben Massen von Spirochäten aufweisen, die jedoch nicht ganz so lebhaft beweglich sind wie die im peripheren Wachstum. Noch weiter nach dem Zentrum hin stösst man auf Bakterien,



Abb. 5.



die, in Symbiose mit Spirochäten verschiedener Art, die inneren Ringe bilden.

Reinkulturen von Spirochäten können erhalten werden,



Abb. 6.

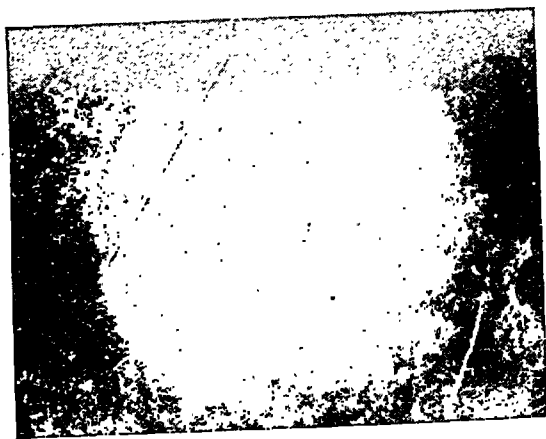


Abb. 7.

Das Wachstum der reinen Spirochätenkultur.

wenn Sekundärkulturen von dem peripheren Wachstum her angelegt werden. Bisweilen gelingt jedoch der erste Umstich nicht, sondern Reinkultur wird erst nach weiteren Umstichen erhalten. Die Reinkultur ist dadurch charakterisiert, dass Ringbildung ausbleibt, und dass das Wachstum das Bild eines

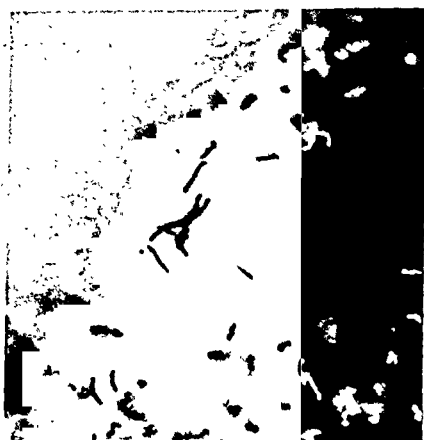


Abb. 8.  
*Treponema microdentium* Nog. Dunkelfeldmikroskop.

homogenen Nebels darbietet, der nach der Peripherie des Substrats hin fortschreitet (siehe Abb. 7). Die Inkubation der Sekundärkulturen muss 4 Tage lang bei 37° erfolgen, erst danach dürfen sie in Thermostat von 30° überführt werden.



Abb. 9.  
Charakteristische Ansammlung von *Treponema macrodentium* Nog.  
Bei A Teilung.

Frisches tierisches Gewebe muss in dem Substrat anwesend sein, damit es zum Spirochätenwuchs in den Sekundärkulturen kommen soll. Ich verwende Stücke von Meerschweinchenhoden, die einem kurz vorher getöteten Tier entnommen sind. Die Stücke werden in die Petrischalen eingebracht, ein Stück in jede Schale (F. Abb. 2), worauf der Agar so aufgegossen wird, dass die Hodenstücke vollständig von dem Substrat be-



Abb. 10.

*Treponema vincenti*. Victoriablau.

deckt sind. Die Platten können im Kühlschrank aufbewahrt werden, jedoch nicht gut länger als höchstens 2 Wochen, da das Substrat sogar im Kühlschrank leicht mit Schimmelpilzen infiziert wird.

Mittels des oben beschriebenen Züchtungsverfahrens ist es mir gelungen, Reinkulturen von *Treponema microdentium* und *macrodentium* wie auch von *Treponema vincenti* zu erhalten (siehe Abb. 8—10). Auch *Treponema buccale* lässt sich mittels desselben Verfahrens züchten. Die Reinzüchtung dieser Spirochäte ist jedoch bisher noch nicht gelungen.

### Zusammenfassung.

Durch eine Modifikation der Fortnerschen Plattenmethode und durch tiefe Versenkung der Aussaat in Serumagarplat-

ten mit geringem Gehalt an Agar (za. 1 %) ist es dem Verf. gelungen, aus Material von Zahnfleischtaschen her Mundspirochäten reinzuzüchten. Das angegebene Verfahren bedeutet eine wesentliche Vereinfachung der früheren Technik.

#### SCHRIFTTUM.

- Gerber, P.*: Über Spirochäten in den oberen Luft- und Verdauungswegen. Zbl. f. Bakt. Orig. 1910 : 56 : 508.
- Gins, H. A.*: Einführung in die Bakteriologie für Zahnärzte. München 1933.
- Noguchi, H.*: Cultural Studies on Mouth Spirochaetae. J. exp. Med. 1912 : 15 : 81.
- Pettit, A.*: Contribution à l'Étude des Spirochétidés. Paris 1929.
- Smith, D. T.*: Fusso-Spirochaetal Disease. London 1932.
- Topley-Wilson*: The Principles of Bacteriology and Immunity. London 1937.

FROM THE UNIVERSITY INSTITUTE OF PATHOLOGICAL  
ANATOMY (CHIEF: PROFESSOR J. ENGELBRETH-HOLM, M.D.)  
and from  
THE CANCER RESEARCH LABORATORY OF THE DANISH  
ANTI-CANCER LEAGUE, COPENHAGEN.

---

## EFFECT ON LEUKEMIA IN MICE FROM LOWERING OF THE BODY TEMPERATURE\*)

By *J. Engelbreth-Holm* and *Helge Ellorm*.

(Received for publication September 5th, 1942).

The effect of variations in temperature on various tumor cells has been the subject of numerous investigations. Experiments in this respect have often shown that the malignant tumor cells were more sensitive than the corresponding normal cells and were destroyed or inhibited by changes in the temperature that affected the normal tissues but slightly or not at all.

*Elevation of the temperature* to 45—47° is fatal to the tumor cells of carcinomatous tissue from mice (in vitro) — as was shown already by C. O. Jensen (1903). Therapeutic experiments have been carried out in particular with employment of elevation of the temperature by means of electrical currents of high frequency.

In 1927 Westermarck showed that carcinomatous tissue as well as sarcomatous tissue transplanted in rats »in most cases disappeared without any particular damage to the surrounding tissue« after

---

\*) The studies here reported were carried out with the aid of grants from Anders Hasselbalch's Leukemia Fond and Consul General Ernst Carlsen and wife's legacy, together with a donation from Mr. J. S. Falck, Merchant, Copenhagen.

such treatment. In this country Overgaard & Okkels have reported some experimental studies with diathermy of transplanted sarcoma (Crocker 180) in mice, in which they were able to confirm that the increased temperature was more injurious to the sarcoma cells than to the normal cells. In experiments with tissue cultures it has also been confirmed that tumor cells are more sensitive to heat than are the corresponding normal cells (Volmar, 1940).

It is to be emphasized, however, that all these experiments were carried out on transplanted tumors which in therapeutic experiments are by no means directly comparable with spontaneous tumors. Most often the latter prove far more resistant to the various forms of treatment than transplanted tumors or tissue cultures.

As far as we have been able to find out, no corresponding observations have been made on spontaneous tumors, and as long as this is the case it will not be justifiable to expect any favorable results from application of »heat therapy« in the treatment of malignant tumors in man.

*Lowering of the temperature* has likewise been employed several times in experimental studies. Here the conditions involved are more difficult to account for, however. While a rise in temperature of 5—10° will kill every cell simply because the proteins are denatured at such temperatures, living cells can stand even considerable chilling without perishing. Here, then, the question is whether normal cells and malignant tumor cells differ in their resistance on exposure to cold.

A number of observations have been published to the effect that tumor cells, like normal cells, can stand freezing and subsequent thawing (e. g., C. O. Jensen, 1903; Auler and collaborators, 1938; Klinke, 1939). It seems, however, as if rapid freezing and thawing will kill the cells, while they are able to survive a slow freezing (Breedis, Barnes & Furth, 1937). According to Breedis & Furth (1938), a gradually refrigerated tumor cell was able to keep alive at —70° for one year and still be able to take on inoculation; and this applied both the sarcomatous, carcinomatous and leukemic cells.

It is obvious, then, that malignant tumor cells are able to vegetate at low temperatures, but it is equally obvious that

this state involves no particular manifestation of vitality. It is an entirely different question how such tumor cells may get along if their vital functions, division, metabolism, etc., have to proceed at subnormal temperatures. Naturally it is of particular interest to learn whether tumor cells differ in this respect from normal cells.

Fay and collaborators have pointed out that primary as well as secondary tumors in man are located in the extremities but seldom, and they are particularly infrequent in the hands and feet — or, in other words, they are rare in those regions of the body where the temperature is lowest. These authors investigated the influence of subnormal temperature on normal cells as well as malignant tumor cells. Through various experiments (Smith, 1939); (Fay & Smith, 1939—40) they thought they were able to demonstrate that there exists a critical temperature, about 35° C, below which generative changes make their appearance in growing chicken embryos as well as in tumor tissue and that the tumor tissue is more sensitive to the subnormal temperature than are the normal cells.

These observations led on to Fay's experiments on cold treatment («hibernation» and »refrigeration») of patients with malignant tumors, but the first-mentioned experimental results as well as the value of the therapeutic method have been disputed and questioned in part (cf. Gerster and collaborators, Gordon & Cresci, Vaughn, Eltorm).

The investigations of Fay & Smith prompted us to try whether the tumor tissue in tumor-carrying mice might be affected by the lowering of the body temperature of the animals. After some futile experiments on lowering of the body temperature (by means of injection of insulin and low environmental temperature), it was found that starvation together with a low external temperature would serve the purpose: after some length of time, the body temperature would fall off to a level about 1—2° above the environmental temperature. As mice die when their body temperature falls below 16—17°, the experimental conditions have to be selected

so that the rectal temperature of the animals stays at about 20° C. At this temperature they may be kept alive for several hours, varying with their general condition, and in most cases it will be possible to warm the animals again and make them survive the exposure.

With this technique we have treated a number of leukemic mice.

The mice here employed have belonged to the Aka strain (Furth), 50—60 % of which had spontaneous leukemia at the age of 8—10 months. It was the mice with spontaneous leukemia that were picked out for the experiment, the lesion being recognizable by the presence of enlarged lymph nodes, anemia and general debility. In order to ensure the accuracy of this diagnosis, an inguinal lymph node was removed for microscopic examination before the respective mouse was given any treatment.

*Technique of Treatment.* — After removal of the lymph node, each mouse is placed in a small tin box, about 10 cm. in diameter, with a 1 cm. layer of sawdust on the floor, chiefly to protect it from an excessive loss of heat. The animals are given no food, and they are placed in a room with a constant temperature of 18—19°, or in a refrigerator at about 6—8°. In either instance the body temperature of the mouse will fall off, sooner or later, most rapidly with the low environmental temperature. In the room at 18—19° C it takes about 24 hours for the rectal temperature to fall (measured thermoelectrically), while this fall is effectuated rather rapidly at the low temperature in the refrigerator where it may take from 3—4 hours up to 12 hours or more. This probably depends entirely on the general condition of the mouse.

When the mouse is kept in the room at about 18°, the body temperature falls to about 19—20°; and at this temperature the mouse may be kept alive for several hours. The mice that are placed in refrigerator have to be inspected very often, and they have to be transferred to the room at 18° as soon as their body temperature falls to about 20°.

With a body temperature of about 20°, the mouse sits



still hunched; at a lower temperature it may topple over, and make only some slow, toad-like movements when it is touched. The pulse and respiratory rate are lowered to a fraction of the normal. Chills are seen during the fall of the temperature. In the period when the temperature is kept at about 20°, the mouse should be handled as little as possible, as every touch will produce a rise in temperature owing to the muscular movements elicited.

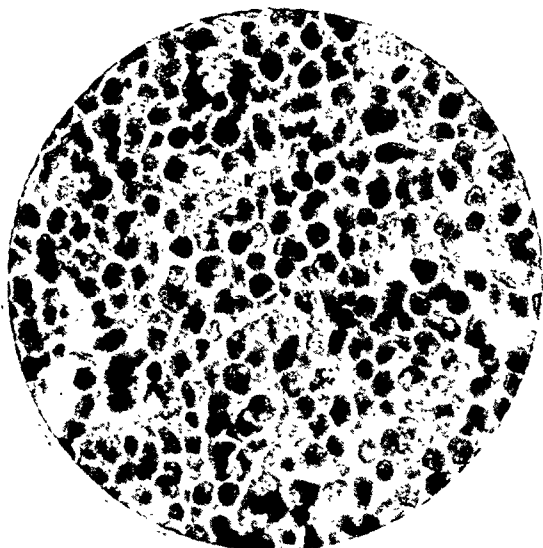
When the general condition of the mouse requires it, an attempt is made to warm the animal. This juncture is often difficult to estimate, as the general condition is difficult to judge of, and because the ability of the mouse to stand the chilling is subject to marked individual variation, the period varying from a few hours to more than 24 hours. This is the most difficult point of the treatment, as more than one-half of the animals will die at this juncture of the experiment.

The experiment comprises a total of 140 mice, 50 of which died of intercurrent diseases or had to be ruled out on account of technical errors of treatment or erroneous diagnosis. Of the remaining 90 mice, 50 were treated 1—3 times and died in immediate connection with the treatment, without their body temperature rising to normal level. These 50 mice form a group by themselves, in which the immediate changes from the cold treatment («hibernation») could be observed (Group I).

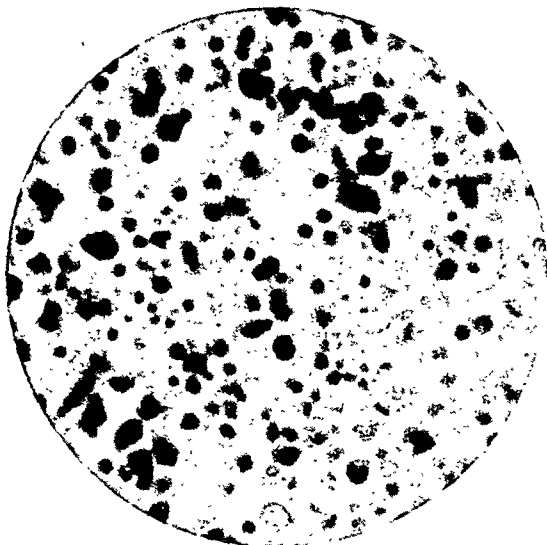
The remaining 40 mice (Group II) have been treated only once, whereafter they were warmed. After the temperature had become normal again, one of the peripheral lymph nodes were removed at varying junctures after the treatment for comparison with the lymph node removed prior to the treatment.

### *Experimental Results.*

In *Group I*, 19 mice were under treatment for up to 5 hours with a body temperature between 15 and 25°, averaging about 20°, while 15 animals were under treatment between 5 and

*Fig. 1.*

Leukemic lymph node from non-treated mouse. The tissue and the lymph sinuses are crowded with unripe leucotic cells without signs of degeneration.

*Fig. 2.*

Lymph node from mouse immediately after treatment with lowered body temperature. No unaffected leucotic cells. Pronounced pycnosis and karyolysis and degeneration of the cells. The nuclei of the reticulum cells and of the connective tissue cells are intact.



*Fig. 3.*

Lymph node from leucemic mouse 24 hours after treatment with lowered body temperature. No leucotic cells are visible. The tissue contains lymphocytes of normal appearance.

10 hours, 8 animals between 10 and 15 hours, 5 animals between 15 and 20 hours and 3 animals over 25 hours.

As mentioned already, all the animals in Group I died in immediate connection with the treatment. On autopsy they all presented the morbid changes in the organs characteristic of leukemia in this strain, but microscopic examination revealed pronounced degenerative changes in the cells in the leukemic infiltrations. It is a rather striking fact that while the leukemic tumor cells everywhere in these animals presented degenerative changes, the normal cells showed no evidence of degeneration whatever.

The changes here involved vary from a peculiar accentuation of the nuclear and cellular membranes, with a tendency to assume a spherical form and with loss of nucleoli, through various stages of pyknosis and karyorrhexis to complete necrosis-like destruction of the cells. If thus we divide the changes into three degrees, the experimental results in

Group I may be tabulated schematically as presented in Table 1.

Table 1.

*Microscopic Changes in the Leukemic Cells in 50 Mice with Spontaneous Leukemia treated with Lowering of the Body Temperature.*

Group I.

Lived with lowered temperature for	Number of animals with changes of			No changes or doubtful	Total
	1°	2°	3°		
a. < 5 hours	3	6	9	1	19
b. from 5 to 10 hours	1	7	4	3	15
c. » 11 » 15 »	1	3	4	0	8
d. » 16 » 20 »	0	1	3	1	5
e. 20 hours	0	0	3	0	3
	5	17	23	5	50

Even though the various subgroups comprised but a few mice, they still conveyed the impression that the degree of the changes probably is connected with the duration of the treatment.

For controls we had 9 leukemic mice that were starved for a period of time corresponding to the period of treatment for the other mice. Not infrequently, however, the controls were fed before the end of the period of treatment, when the general condition of the animal required it. For it was found that even when the starving animals are placed in a room with a temperature over 25° — for instance, 28°, the body temperature may fall off rather suddenly and the animals succumb quickly. For this reason, the starvation period was limited to about 24 hours which generally was tolerated well. Of the 9 animals, 4 were starved once, 3 were starved twice and 2 animals 3 times. None of these animals presented any sign of degenerative changes in the lymph nodes or in the organs in which leukemic changes are located.

*Group II* comprises 40 mice.

As mentioned, efforts were made here to make the mice survive the treatment as long as possible, in order to enable us to follow the reactions in the lymph nodes. Hence lymph nodes were removed at various junctures, up to several days after the conclusion of the treatment.

The microscopic examination of these lymph nodes shows a number of interesting features.

For one thing, as in *Group I*, pronounced degenerative changes in the leukemic cells with deterioration of nuclei and cells were regular findings in the lymph nodes removed immediately after the treatment. But it is a striking fact that *these degenerated cells disappear within the first 24 hours after the conclusion of the treatment*. After this point of time, the characteristic degeneration was seen but seldom (see Table 2).

After the first day, the *leukemic infiltrations are seen to diminish and disappear*. In some cases it has even been impossible to demonstrate any leukemic changes in lymph nodes removed 1—4 days after the treatment in animals which prior to the treatment showed distinct leukemic changes. This change is only transitory, however, and seen only after energetic treatment, that is, only in 6 out of 18 animals that were treated for more than 15 hours with a lowering of the temperature to below 25° (see Table 2).

This disappearance of the leukemic infiltrations, which usually is most pronounced about 3—5 days after the treatment, is in turn replaced by the reappearance of leukemic processes, which within 1—2 weeks lead on to fully developed leukemia to which the animals succumb, presenting the usual changes on autopsy.

One mouse (20815) appeared on autopsy to have recovered from the leukemia. But this animal lived only 11 days after the conclusion of the treatment, when it died of an intercurrent disease, so that probably its recovery is merely apparent, as the mouse possibly died at the very

junction when the temporary effect of the treatment was most pronounced.

### *Comments.*

We have tried to calculate the average lifetime for the mice surviving the treatment and have arrived at the result that the treated mice lived 6—7 days longer than the controls. For this calculation it was necessary to rule out a great many of the animals as they died of intercurrent diseases. The result is then that 27 animals lived on an average 26.4 days, while 15 controls lived on an average for 20 days. This corresponds to the observation that the microscopic changes under the treatment disappeared completely or partially for 6—7 days. Thus, the prolongation of the lifetime also affords a sort of confirmation of the microscopic findings,

The animals have varied rather considerably in their individual response to the treatment. Some have not reacted to the treatment at all, while others have reacted with a conspicuous improvement, evident from their general condition as well as the microscopic findings. This is probably connected with variations in the general condition of the animals and in the capacity of the leukemic cells for regeneration, which may reasonably be assumed to vary from one individual to another. For here we are dealing with instances of spontaneous leukemia in animals belonging to different age-classes and taken under treatment at different junctures of their illness. Finally, the duration of the treatment and the therapeutic temperature have not been the same for all the mice. As mentioned, the temperature has varied from 15° to 25°. Probably these two factors play the more essential role in the individual variations of the response to the treatment.

Although we have not succeeded in curing any instance of spontaneous mouse leukemia, the reported experiments show that the leukemic cells are far more sensitive to a lowering of the body temperature (to 15—25°) than are the

Table 2.

Changes in Lymph Nodes in 40 Mice with Spontaneous Leukemia that have been Chilled to 15--25° for 4--40 Hours and Survived this Treatment.

Mouse No.	Lifetime after treatment	Treatment, Body T <sub>p</sub> , under 25° for hours	Changes in lymph nodes Before treatment	Leukemic changes in lymph nodes after refrigeration											Changes observed on autopsy	
				0	1	2	3	4	5	6	7	> 7	3' nodes (8' day)	4' nodes		
5 hrs.	6693	12	4	++	++									++	++	++
	7472	11	5	++	++			++		++				++	++	++
	6601	23	9	++	++								++	++	++	++
	6739	12	6	++	++		+						++	++	++	++
	6945	47	8	++	++								+	++	++	++
10 hrs.	7338	8	7	++	++					+				+	++	++
	7012	17	6	++	++								++	++	++	++
	6495	19	6	++	++	+							++	++	++	++
	6864	11	8	++	++								++	++	++	++
	7574	11	9	++	++						++		++	++	++	++
	7678	13	8	++	++		++		++				++	++	++	++
	7094	28	10	++	++							+	++	++	++	++
	7096	12	12	++	++							+	÷		+	+
	6689	25	12	++	++							++	(14' day)		++	++
	7732	9	11	++	++										++	++
	7606	11	11	++	++			++						++	++	++
	7139	11	12	++	++			++					++	++	++	++

[illegible]



normal cells, which in no instance have presented the signs of degeneration typical of the leukemic cells.

The treatment here employed has brought about a considerable reduction in the leukemic infiltrations, and it has prolonged the lifetime of the animals. But it has to be emphasized that the effect here observed has merely been temporary, although it was so pronounced as to make it impossible in some cases on histological examination to demonstrate any leukemic changes.

### *Summary.*

Mice with spontaneous leukemia are treated with lowering of the body temperature. On starvation and staying in a room at 6—8° or 18°, the body temperature of the mouse falls off to a few degrees above the environmental temperature. It is possible to keep some of the animals alive with a body temperature of 15—25° for up to 40 hours.

Altogether 140 mice with spontaneous leukemia are treated in this way. Of this total, 50 died with intercurrent diseases or were ruled out for other reasons; 50 died in connection with the treatment, while 40 survived it.

Lowering of the body temperature brings about some pronounced degenerative phenomena in the leukemic cells, from slight changes to pyknosis, karyorrhexis and total destruction of the cell, whereas the normal cells present no morphological evidence of degeneration.

Examination of lymph nodes removed at various points of time after the treatment shows that these degenerated cells disappear within 3—4 hours, whereafter the leukemic infiltrations subside — that is, if the treatment has lasted at least about 15 hours — and may disappear completely in 3—5 days so as to be non-demonstrable even on microscopic examination. This effect is merely temporary, however, as the leukemic infiltrations reappear, increase in size, and kill the animal. But the lifetime of the animal has been prolonged

distinctly, corresponding to the »improvement« after the treatment.

Leukemic cells in mice have thus been demonstrated to be distinctly more sensitive than normal cells to lowering of the body temperature.

#### REFERENCES.

- Auler, H., Koeniger, W., Schlottmann, H., St. Bylina & Schmidt, H.:  
Ztschr. f. Krebsforsch. 47: 371, 1938.
- Auler, H. & St. Bylina: Ztschr. f. Krebsforsch. 46: 407, 1937.
- Breedis, C., & Furth, J.: Science. 88: 531, 1938.
- Breedis, C., Burnes, W. A. & Furth, J.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.  
36: 220, 1937.
- Eltorm, H.: Klin. Wchnschr. 21: 641, 661, 1942.
- Fay, T. & Henny, C. G.: Surg. Gynec. & Obst. 66: 512, 1938.
- Gerster, John, C. A. and collaborators: Bull. New York Acad. Med.  
16: 312, 1940 ref. J. A. M. A. 114: 2390, 1940.
- Gordon, C. A. & Cresci, J. V.: Am. J. Obst. & Gynec. 41: 281, 1941.
- Jensen, C. O.: Zentralbl. f. Bakt. 1 Orig. 34, 1903.
- Klinke, I.: Ztschr. Krebsforsch. 48: 406, 1939.
- Overgaard, K.: Ugesk. f. Læger, 663, 1934 and 333, 1935.
- Overgaard, K. & Okkels, H.: Nord. Med. 7: 1317, 1940.
- Strahlentherapie, 68: 587, 1940.
- Smith, L. W.: Arch. Path. 28: 420, 1939.
- Smith, L. W. & Fay, T.: J. A. M. A.: 113, 653, 1939.
- Am. J. Clin. Path. 10: 1, 1940.
- Vaughn, A. M.: J. A. M. A.: 114: 2293, 1940.
- Westermarck, Niels: Skandinav. Arch. f. Physiol. 52: 257, 1937.
- Vollmar, H.: Ztschr. f. Krebsforsch. 51: 71, 1940.
- Vollmar, H. & Inouye: Arch. f. exper. Zellforsch. 23: 27, 1939.

FROM THE UNIVERSITY INSTITUTE OF PATHOLOGICAL  
ANATOMY, COPENHAGEN  
(CHIEF: PROFESSOR J. ENGELBRETH-HOLM, M. D.)  
AND FROM THE CANCER RESEARCH LABORATORY OF  
THE DANISH ANTI-CANCER LEAGUE, COPENHAGEN

---

## INFLUENCE OF CARCINOGENIC HYDROCARBON UPON TRANSPLANTED LEUKEMIA\*)

By *S. Stamer* and *J. Engelbreth-Holm*.

(Received for publication September 5th 1942).

As demonstrated first by Haddow in 1935, besides inducing growth of tumors in various tissues, the carcinogenic hydrocarbons may also under certain conditions exert an inhibitory effect on the growth of manifest malignant tumors. Apparently the carcinogenic faculty of these hydrocarbons has a cancerizing effect on the normal cell and an inhibitory effect on the malignant tumor cell — an apparently paradoxical action we shall return to later on.

Since these observations were published by Haddow, many experiments have been reported which confirmed these findings in one way or other, but some of them show also that the animals suffer rather markedly under the treatment with the toxic hydrocarbons. Thus, Pollia (1938) thought that the inhibition of the growth of tumours was not attributable to any specific effect of the carcinogenic hydrocarbon but resulted merely from the often

---

\*) Part of a lecture given by J. Engelbreth-Holm in the Karolinske Institutet, Stockholm, on April 23, 1942.

The studies here reported were carried out with the aid of grants from Anders Hasselbachs Leukemia Fond and Consul General Ernst Carlsen and wife's legacy.

considerable loss in weight of the animals under this treatment. It seemed desirable, therefore, to investigate this question more thoroughly.

In previous experiments, one of us (Stamer, 1941) has shown that actually the tumor inhibition observed was largely due to the loss in weight of these animals. Now and then, however, there was also some inhibition of the growth of the tumors that had to be ascribed to a specific effect of the carcinogenic hydrocarbon. Stamer's experiments showed, for one thing, that the inhibition of the growth of transplanted tumors observed after intraperitoneal injection of dimethyl-benzanthracene, which is highly toxic, is no greater than the inhibition of growth obtained by starving the animals so that their weight curve runs parallel with the one of the hydrocarbon-treated intoxicated animals.

These experimental results lend essential support to Pollia's assertion that the effects observed by Haddow and others may very well be unspecific and attributable to a general toxic effect. But, as mentioned, they also showed that the inhibition of the growth of the tumor in some experiments was stronger than might be expected, and this applied in particular to certain tumors, suggesting an additional specific effect from the treatment.

We therefore looked for a way of applying the hydrocarbon so that the tumor would be exposed to the action of the carcinogenic substance without the animal being effected too much by its toxic effect. Strange to say, it was found that intravenous injection of colloid solutions — or finely granular watery suspensions — of the hydrocarbons lowered the general toxic effect to a minimum without detracting from the inhibitory action on the tumor tissue.

Peacock & Beck (1938) were the first to treat transplanted tumors with intravenous injection of 3:4-benzpyrene and colloid aqueous solution and found this treatment very effective against a carcinoma in 6 out of 13 mice.

Undoubtedly the difficulty in bringing the carcinogenic substances into aqueous colloid solution is the reason why

such experiments have not been carried out to a greater extent. Generally the concentrations of such solutions will not exceed about 1 ‰, and this will naturally preclude injection of sufficient amounts of the substance. Our previous experiments have shown that in order to obtain any effect whatever in mice, the animals have to be treated with relatively large doses of the hydrocarbon in question, presumably at least 7—10 mg. distributed, for instance, over 5 injections. As will be seen from the following, encouraging experimental results were not obtained till it became practicable to make more concentrated suspensions of these substances.

The fact that mice very well stand intravenous injection of doses which would have a very strong, even lethal, toxic effect if given intraperitoneally or subcutaneously might be taken to suggest that the substance undergoes chemical changes in the preparation of the colloid solution or granular watery suspension employed for the intravenous injections. A priori, this is not very likely, however, because the hydrocarbons here concerned are only slightly active and have generally proved to be very stable; furthermore, the processes employed for further preparations of the solutions (see below) are not likely to produce any changes in the composition of the hydrocarbons.

Experimentally we have made sure that at any rate the hydrocarbon employed in the present studies — 9:10-dimethyl-1:2-benzanthracene — has preserved its carcinogenic property unchanged after being suspended in water. The carcinogenic potency was found to equal that of a corresponding solution in oil.

Among 12 animals (mice) of the strain Street, which had received 0.5 mg. dimethyl benzanthracene in watery suspension subcutaneously, 6 developed sarcoma and 1 leukemia after an average of 125 days.

Among 14 animals of the same strain which were given 0.5 mg. of this substance dissolved in olive oil subcutaneously,

7 presented sarcoma and 1 leukemia after a period of 147 days.

So, at any rate, the carcinogenic property of this substance has not been lowered by its suspension in water.

With such watery suspensions, the dispersity of which approaches that of the colloid solution, we have to influence the course of transplanted leukemia in mice of the »Aka« strain.

In the first experiments of this kind, with injection of 9:10-dimethyl-1:2-benzanthracene in colloid aqueous solution of 0.5 ‰ injected subcutaneously into Aka mice with transplanted leukemia, the low concentration of the solution prevented the animals from receiving more than altogether 1 mg. of the substance.

A total of 42 Aka mice were given leukemia by transplantation. These animals were divided into experimental animals and controls. During the experiment 4 animals were ruled out: 3 experimental animals that died of air embolism, and 1 control that died of enteritis. There then remained 17 experimental animals and 21 controls. On the day after the transplantation, treatment was instituted with intravenous injections of 9:10 = dimethyl-1:2-benzanthracene suspended in water. On the second day after the transplantation 0,25 mg. of the substance was injected, on the 4' day 0.5 mg., and on the 6' day 0.25 mg. Thus the treated animals received altogether 1 mg. of 9:10-dimethyl-1:2-benzanthracene.

In this experiment no more than the three injections could be given. The animals were under daily observation, and the controls appeared to be affected by the disease more rapidly than the treated animals, but the latter were getting exhausted rather rapidly too, and the two groups died at about the same time, the treated animals living on an average 19.6 days, the controls 18.9. The treated animals were not affected by the injections, and on autopsy they presented no abnormality apart from the leukemic infiltrations, which macroscopically and microscopically showed the same features in the treated animals and in the controls. One of the treated animals sur-

vived for rather a long time (27 days). All told, however, the difference between the two groups was only slight.

In another experiment we were able to give the animals 1.5 mg. of the substance. Here 52 Aka mice were given transplants of leukemic tissue from an Aka mouse with spontaneous leukemia. The animals were divided into two groups, one of which was treated with six intravenous injections, from the 7' to the 17' day after the transplantation, each of 0.5 cc. of aqueous solution containing 0.25 mg. of hydrocarbon.

52 Aka mice were made leukemic by transplantation. They were divided into two groups, treated animals and controls, and treatment was instituted 7 days after the transplantation with intravenous injections of 9:10-dimethyl-1:2-benzanthracene, given on the 7', 9', 11', 13', 15' and 17' day, 0.25 mg. at each injection, making the total dose 1.5 mg. During this experiment several of the treated animals had to be ruled out, some because they died of air embolism, others because it was not possible to give them all the six injections included in this treatment. On the whole, the technical part of these injections, the *repeated* intravenous injections into the tail of mice that often are very ill, is rather difficult.

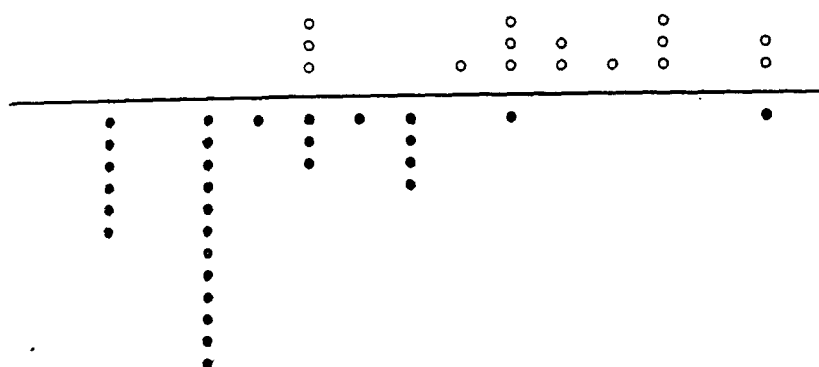
At the end of the experimental period there thus remained 15 treated animals and 29 controls. They were all observed daily, and it was quite conspicuous that the controls were affected by the illness long before the treated animals; they were noticeably more poorly with straggled coat and sluggish movements; and on an average they died 22.2 days after the transplantation, whereas the treated animals survived the transplantation by 27.8 days.

Autopsy showed pronounced leukemic changes in the treated animals as well as in the controls, and the histological examination presented the same picture in both groups.

The lifetime for the individual mice in this experiments is presented graphically in Fig. 1.

There can hardly be any doubt that this treatment has brought about an inhibition of the development of the leukemic

17' 18' 19' 20' 21' 22' 23' 24' 25' 26' 27' 28' 29' 30' 31' 32'day



o Experimental animals: average lifetime 27,8

• Control animals: average lifetime 22.2

*Fig. 1.*

Lifetime for untreated mice with transplanted leukemia (o) and for similar mice treated with 0.5 mg. of dimethylbenzanthracene intravenously (•).

processes even though none of the animals recovered. Like the 29 controls, they all died of leukemia, but the treated animals lived longer. While the controls died on an average after 22 days, the average lifetime of the treated animals was 28 days, that is, their lifetime was prolonged by about 30 %.

Subsequently we were able to prepare more concentrated suspensions of 3 ‰ and 5 ‰, which were tolerated well, and with which we made some new experiments.

The watery suspension was prepared originally ad modum Boyland by letting an acetone solution drop into hot water or a hot solution of gelatine.

The improvements consist partly in the employment of CO<sub>2</sub>-free water, partly in covering the surface of the water with a layer of oil or paraffin (saturated with the hydro-



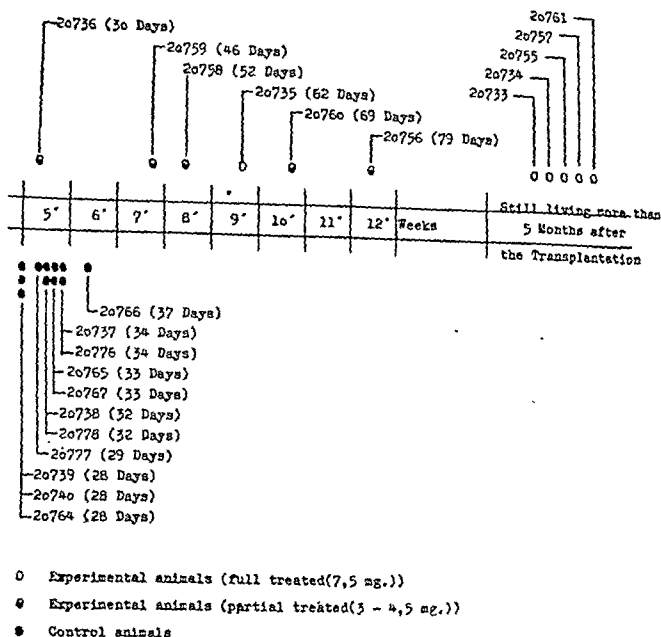


Fig. 2.

Lifetime of mice with transplanted leukemia. Controls and mice treated with 7.5 mg. of dimethyl-benzanthracene or with a smaller dose (4.5 mg.).

carbon), as the atmospheric  $\text{CO}_2$  causes precipitation of the substance in the suspension.

The acetone is removed by aeration with  $\text{CO}_2$ -free air.

It is possible in this way to make a 5‰ suspension suitable for intravenous injection. It is quite homogeneous, egg-yolk-yellowish in color and thin; on dilution with water it is homogeneous and opalescent.

Altogether 22 Aka mice were given leukemia by transplantation from a leukemic Aka mouse. These animals were divided into two groups, one of which was treated with 5 injections of 1.5 mg. of 9:10 = dimethyl-1:2-benzanthracene, given in 1—9 days after the transplantation, making a total dose of 7.5 mg.

The treatment was carried through successfully in 6 animals. The fate of all 22 mice is presented graphically in Fig. 2.

As shown in Fig. 2 all the controls died within a relatively short interval (28—37 days).

The treated animals live considerably longer, and all of them that received all 5 injections are living yet at this writing, 5 months after the transplantation, except for one that died of enteritis 65 days after the transplantation. On autopsy and microscopic examination the last-mentioned animal showed no evidence of leukemia. The 5 surviving treated animals show no sign of leukemia whatever, and hence they have to be looked upon as completely recovered.

All the remaining treated animals, which had been given only 2—3 injections, died with fully developed leukemia, but in their case the disease had been inhibited markedly as on an average they lived twice as long after the transplantation as did the controls.

Besides the striking fact that 5 mice were treated successfully for transplanted leukemia, this experiment shows very plainly that 9:10 = dimethyl-1:2-benzanthracene is tolerated well even in strikingly large doses when it is given intravenously. For 7.5 mg. is an enormous dose inasmuch as 1 mg. given intraperitoneally or subcutaneously would kill the animals. Further, it is quite remarkable that the 7.5 mg. of this substance injected into the blood stream has produced no tumor growth in the organism. It looks as if the intravenous application of this substance implies no particular risk of development of any tumor, and the same holds good for other experiments we have carried out — a peculiar fact which has not yet been investigated sufficiently.

The experiments here presented show indisputably that treatment with dimethyl benzanthracene, given intravenously in large doses can delay the fatal outcome of transplanted leukemia in mice of the Aka strain, and in some cases even cure such animals.

In previous experiments (Engelbreth-Holm, 1939; Engelbreth-Holm & Lefèvre, 1942) it has been shown that the same substance in normal animals of the same strain under suitable experimental conditions (subcutaneous injection or, pre-

ferably, painting of the skin in young animals) can promote the development of leukemia considerably.

The question is then how this apparently paradoxical findings is to be interpreted: that the same substance which in young animals can bring about an acceleration of the development of leukemia (and tumor) is able to inhibit the growth of the leukemic cells — nay, even check their growth so completely that it is justified to speak of recovery — when it is injected in animals who already have manifest leukemic tissue in their organism.

For that matter, a similar paradoxical antagonism is known from X-ray and radium irradiation, which can inhibit or kill the tumor cells as well as induce malignant growth in normal tissue or accelerate the development of spontaneous tumors in inbred strains of mice.

---

According to the classical view of tumor cells as cells provided with new properties that make them particularly vital and particularly active cells, the finding here recorded can hardly be taken as anything but a paradoxical and unexplainable outcome of antagonism.

This conception of the tumor cells — which, as a matter of fact is implied by the current expressions to »stimulate« or »irritate« a tissue to tumor formation — is losing ground nowadays. Many authors hold already that it ought to be replaced by a quite different conception of the tumor cells that is more in keeping with the numerous results of widely different character reported from innumerable laboratories all over the world that are not compatible with the old conception of the tumor cells as hypervital cells.

Recent investigations on the differentiation and organization of the cells of leukosis — in particular the studies reported from U. S. A. by Potter — have shown quite plainly that the cells of leukosis *differentiate more slowly* than normal cells, but they *keep differentiating* (for details, see Engelbreth-

Holm, 1941). The rate of differentiation in the tumor is closely related to its malignancy, for the more slow the differentiation, the more numerous are the mitoses, and the more rapid is the growth of the tumor in general; the greater its content of non- or slightly differentiated cells, the greater is its malignancy.

That the organization of the cells is defective too is a well-known thing, the very lack of organization being one of the best histological criteria of malignancy.

The great frequency of mitotic figures that often is found in tumor tissue need not necessarily mean that the tumor cells are more »vital« than other cells. The large number of mitoses may be explained as resulting from a decreased rate of differentiation, but it may be attributable also to the possible circumstance that the individual mitosis in tumor cells takes a longer time than normally, that is, evidence of a decrease in, or inhibition of, the vital manifestations of the tumor cell — in contrast to earlier views.

Also in an entirely different respect the tumor cells have proved to be defective or inhibited cells, namely: in their metabolism. As pointed out first by Warburg and later substantiated through many other investigations, especially the very essential contributions given by Swedish investigators in this field (for details see v. Euler & Skarzynski, 1942) the metabolism of tumor cells has proved to be defective as compared to that of normal cells.

In analogy hereto, a great number of investigations on the action of the carcinogenic hydrocarbons have led to results that have to be interpreted in this way: that their effect consists in an inhibition of the functions of the cells including, among others, their metabolism and differentiation.

Considered in the light of such investigations, the experimental results mentioned here are anything but paradoxical.

If we look upon the malignant tumor cells as cells that have lost a number of functions or a part of the normal functions, that is, as defective cells, and if we maintain that

carcinogenic hydrocarbons are capable of producing these defects characteristic of tumor cells, there is nothing peculiar in the finding that treatment with these substances can promote the transformation of normal into tumor cells, as we have seen in the experiments where treatment with dimethyl-benzanthracene accelerated the development of leukemia in mice.

Nor is it to be wondered that further exposure to this agent — this noxious agent which is able to interfere so decisively with the metabolism and differentiation of the cells — may lead to the result that the defective tumor cells are killed through the complete inhibition of one or more of their functions.

Figuratively, this trend of events, we think, may roughly be conceived to proceed as follows: on treatment with carcinogenic hydrocarbon, a normal cell is inhibited in its function to such an extent that the result is a tumor cell, and further treatment of the same kind may give further inhibition, resulting in the death of the cell.

Even though many stones are still wanting in the mosaic which ultimately will show us the true nature of the tumors, the view advanced here appears to be the only one which for the present can give an adequate explanation of both the observations here reported.

### *Summary.*

Intravenous injection of a colloid watery suspension of the carcinogenic hydrocarbon 9:10-dimethyl-1:2-benzanthracene inhibited the development of mouse leukemia induced by transplantation of leukemic tissue.

Small doses of this substance (1.5, 3 and 5 mg.) were seen to prolong the lifetime of the animals, whereas administration of large doses (a total dose of 7.5 mg. in suspensions of 0.5 %) actually cured all the five animals given this treatment.

All the untreated controls died within 20—30 days, showing a fully developed leukemia.

The writers discuss the significance of these results to our understanding of the effect of carcinogenic hydrocarbons and of the nature of leukotic cells.

#### REFERENCES

- Haddow, A.*: Nature. 136: 868, 1935.  
— J. Path. & Bact. 47: 567 and 581, 1938.  
*Pollia, J. A.*: Radiology, 29: 683, 1938.  
*Engelbreth-Holm, J.*: Folia haemat. 63: 319, 1939.  
— Leukemia in Animals. Oliver & Boyd. Edinburgh 1942.  
— & *Lefèvre, H.*: Ugesk. f. Læger. 208, 1941.  
*Stamer, S.*: Acta path. & microbiol. Scand. 18: 533, 1941.  
*v. Euler & Skarzynski*: Biochemie der Tumoren. Enke. Stuttgart 1942.

## EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ENTSTEHUNG DER ANAEMIEN BEI THROMBOSEN IM PFORTADERGEBIET UND DIE BEDEUTUNG ANTIANAEMISCHER STOFFE DES MAGENS

Von *Ernst Wollheim*.

(Eingegangen bei der Redaktion am 7. Juli 1942).

Klinisch findet man bekanntlich bei thrombotischen und embolischen Prozessen im Pfortadergebiet, insbesondere bei der Milzvenenthrombose, eine mehr oder weniger ausgeprägte Blutarmut. Diese hat den Charakter einer hypochromen sekundären Anaemie. Ihre Entstehung wird in der klinischen Literatur ganz allgemein auf Blutungen in den Magen und Darmkanal zurückgeführt. So bezeichnete Eppinger Magenblutungen als ein konstantes Symptom der »primären Milzvenenthrombose«, eines Krankheitsbildes, das dieser Autor für nicht ganz selten hält. Demgegenüber fand O. Lubarsch unter einem grossen Berliner Sektionsmaterial von 30064 Fällen nur 65 reine Thrombosen der Milzvenen, also 2,16 auf 1000. Besonders betont Lubarsch, »dass keiner der 65 Fälle dem von Eppinger entworfenen Bild der klinisch nachweisbaren Milzvenenthrombose entsprach und auch anatomisch keine Anzeichen von Magenblutungen, die zu den Hauptanzeichen neben der Milzvergrösserung, dem Fieber und der Leukopenie gehören, bestanden.« Die pathologische Anatomie konnte also nicht die Auffassung bestätigen, dass die Ursache der Blutarmut bei Milzvenenthrombosen grössere Blutungen in den

Magen oder Darmkanal wären. Auch einzelne klinische Erfahrungen sprechen dagegen, Kranke, die bei Thrombosen im Pfortadergebiet anaemisch wurden, ohne irgendwelche Symptome grösserer Blutungen in den Magen oder Darmkanal erkennen zu lassen. Sind aber nicht Blutungen die Ursache dieser Anaemien, wie entstehen sie dann? Die experimentelle Untersuchung dieser Frage bildete den Ausgangspunkt dieser Arbeit. Ihre Ergebnisse führten bald über die anfängliche Fragestellung hinaus zu einem allgemeineren Problem: den funktionellen Beziehungen zwischen Magen und Erythropoese.

Die gestellte experimentelle Aufgabe verlangte die Erzeugung von Thrombosen in der Milzvene und in anderen Venen des Pfortadergebietes bei geeigneten Versuchstieren. Zu diesem Zweck wurden die betreffenden Gefässe doppelt unterbunden, zum Teil auch zwischen den Ligaturen durchtrennt. Bei den Versuchstieren musste die Kontrolle des Blutstatus in Abständen von wenigen Tagen über einen Zeitraum von mehreren Monaten möglich sein. Es wurden daher Kaninchen und Hunde gewählt.

### *Versuchsanordnung:*

Bei 35 Kaninchen und 4 Hunden wurde zunächst in einer Vorperiode von 10 bis 14 Tagen täglich oder jeden zweiten Tag aus der Ohrvene der Gehalt des Blutes an Haemoglobin (Sicca-Haemometer von Hesse), an Erythrocyten und Leukoocyten (Bürckersche Zählkammer) bestimmt. Ferner wurde das Differentialblutbild (panchrome Färbung nach Pappenheim) ausgezählt und die Anzahl der supravital färbbaren Reticulocyten (Brillantkresylblau, Methode Cesaris-Demel) auf je 1000 Erythrocyten bestimmt. Sodann wurde in Aethernarkose, bei den Hunden nach vorheriger Injektion von 2 bis 2,5 cc 1%iger Morphium-Lösung, einer der weiter unten genannten operativen Eingriffe unter sterilen Kautelen ausgeführt. Das Blut der Versuchstiere wurde in den ersten 3 bis 4 Wochen nach den Operationen täglich oder jeden zweiten Tag in gleicher Weise untersucht, später 1 bis 2 mal wöchentlich.



Die Beobachtungszeit erstreckt sich bei den Hunden und bei 22 der Kaninchen jeweils über 2 bis 6 Monate. Zwei der Hunde und 18 der Kaninchen wurden 8 bis 20 Wochen nach der ersten Operation einem zweiten operativen Eingriff unterzogen, bei dem eine andere Vene als bei der ersten Operation unterbunden wurde. Die Lokalisation dieser Eingriffe am gleichen Tier wurde von Fall zu Fall variiert. Von diesen mehrfach operierten Kaninchen überlebten aber nur 10 lange genug, um eine Beurteilung der Blutveränderungen zu ermöglichen. Bei den meisten Kaninchen wurde in der Vorperiode und in der Beobachtungszeit nach den Operationen der Stuhl auf occultes Blut untersucht (Guajak- und Benzidin-Probe). Bei Hunden ist diese Untersuchung nicht durchführbar. Selbstverständlich wurden die Operationsfolgen bei allen Tieren durch genaue Inspektion bei einem wiederholten Eingriff, bezw. durch die Obduktion kontrolliert. Nach der Lokalisation der experimentellen Thrombosierungen ist das Versuchsmaterial in 6 Serien zu teilen:

- 1) Unterbindung der Vena lienalis vor ihrer Vereinigung mit der Magenvene (»isolierte Milzvenenthrombose«).
- 2) Unterbindung bezw. Unterbrechung der V. lienalis und aller venösen Verbindungsgefäße zwischen Magen und Milz, der Vv. gastro-epiploicae. Der Abfluss des venösen Blutes vom Magen durch die V. coronaria ventriculi zur V. portae bleibt hierbei, ebenso wie in Serie 1 unbehindert.
- 3) Unterbindung der grossen Magenvene, der V. coronaria ventriculi, kurz vor ihrer Vereinigung mit der Milzvene. Der Abfluss des venösen Blutes von der Milz durch die V. lienalis zur V. portae, ebenso der des Blutes vom Magen durch die Vv. gastro-epiploicae, bleibt unbehindert.
- 4) Unterbindung bezw. Unterbrechung der V. coronaria ventriculi und gleichzeitig aller gastro-lienalen Venen (Vv. gastro-epiploicae). Der Abfluss des gesamten venösen Blutes vom Magen zur Pfortader wird blockiert,

während der des Blutes von der Milz durch die V. lienalis in die V. portae unbehindert bleibt.

- 5) Unterbindung der V. coronaria ventriculi gleichzeitig mit Exstirpation der Milz. Es gelangt also weder vom Magen noch von der Milz Blut in die Pfortader.
- 6) Unterbindung der V. mesenterica superior, als Kontrollversuch. Die Zirkulation des venösen Blutes von Magen und Milz, wie in der V. portae selbst, ist unbehindert.

Unterbunden bzw. durchschnitten wurden nur venöse Gefässe, unter peinlicher Schonung aller Arterien. Nur bei der Unterbindung der Vv. gastro-epiploicae liess sich nicht in allen Fällen die Unterbindung der Begleitarterien vermeiden. Die Versuchsergebnisse wurden für jede dieser Serien mit Ausnahme der 6. durch mindestens fünf langfristig beobachtete Tiere gesichert.

#### *Versuchsergebnisse:*

1) Nach *Unterbindung der V. lienalis* vor ihrer Vereinigung mit der V. coronaria ventriculi, also bei »*isolierter Milzvenen-Thrombose*«, bleibt bei mehr als der Hälfte der Versuchstiere (2 Kaninchen, 2 Hunde) der Haemoglobin-, Erythrocyten- und Reticulocyten-Gehalt des Blutes unverändert. Nur bei zwei Kaninchen nahm, 2—3 Tage nach der Operation beginnend, der Haemoglobingehalt um 20 bis 30 % ab, und die Zahl der Erythrocyten pro cmm verminderte sich gleichzeitig um etwa 1 Million. Diese Anaemie verschwand nach 2 Wochen spontan, nachdem einige Tage vor ihrem Rückgang die Zahl der Reticulocyten im strömenden Blut vorübergehend auf 50 bis 70 pro Mille angestiegen war. Mit dem Erreichen der normalen Ausgangswerte für Haemoglobin und Erythrocyten kehrten auch die Reticulocytenzahlen zur Norm zurück (s. Abb. 1). Der Leukocytengehalt des Blutes und das Differentialblutbild zeigten keine charakteristischen Veränderungen, insbesondere niemals eine Leukopenie. Im Stuhl kein occultes Blut.

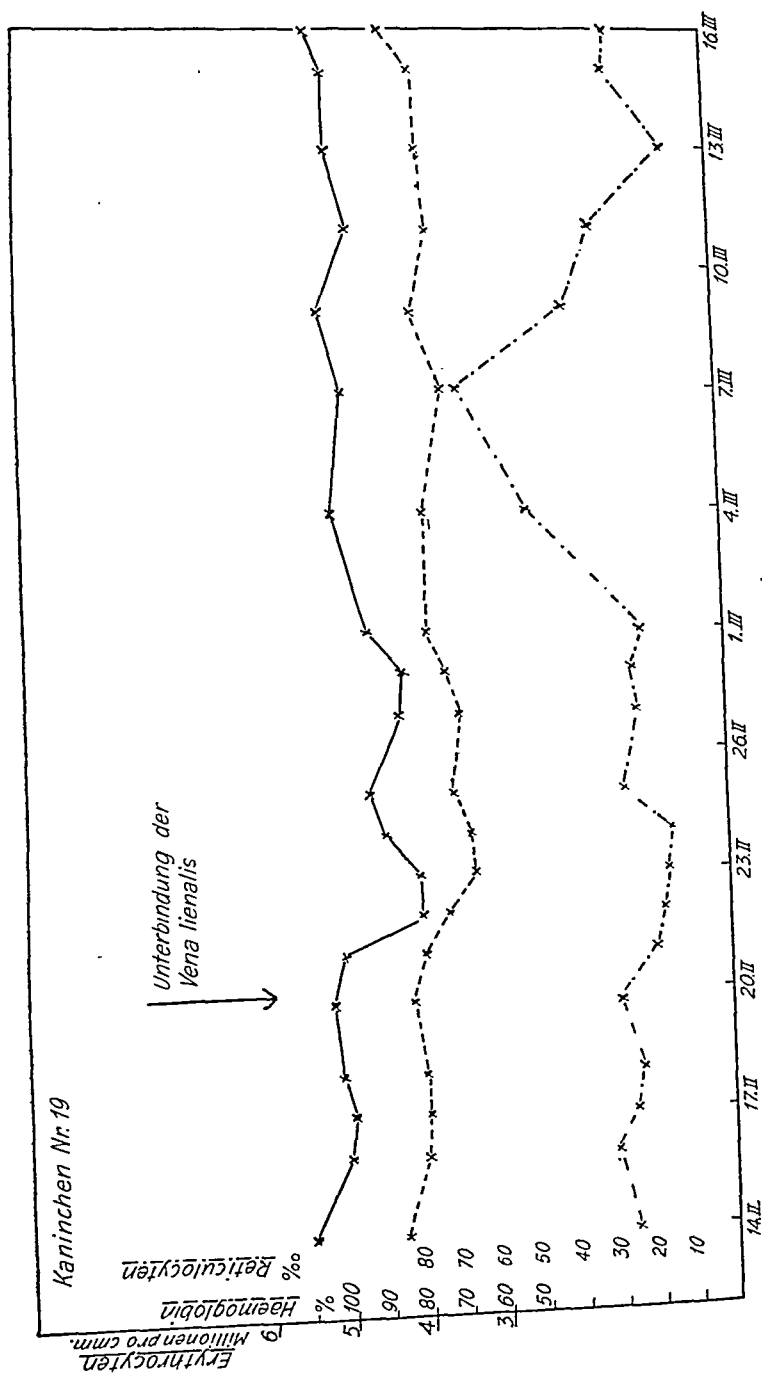


Abbildung Nr. 1.  
Kaninchen. Erythrocyten-, Haemoglobin- und Reticulocyten-Gehalt des Blutes aus der Ohrvene, vor und während 24 Tagen nach Unterbindung der V. lienalis.

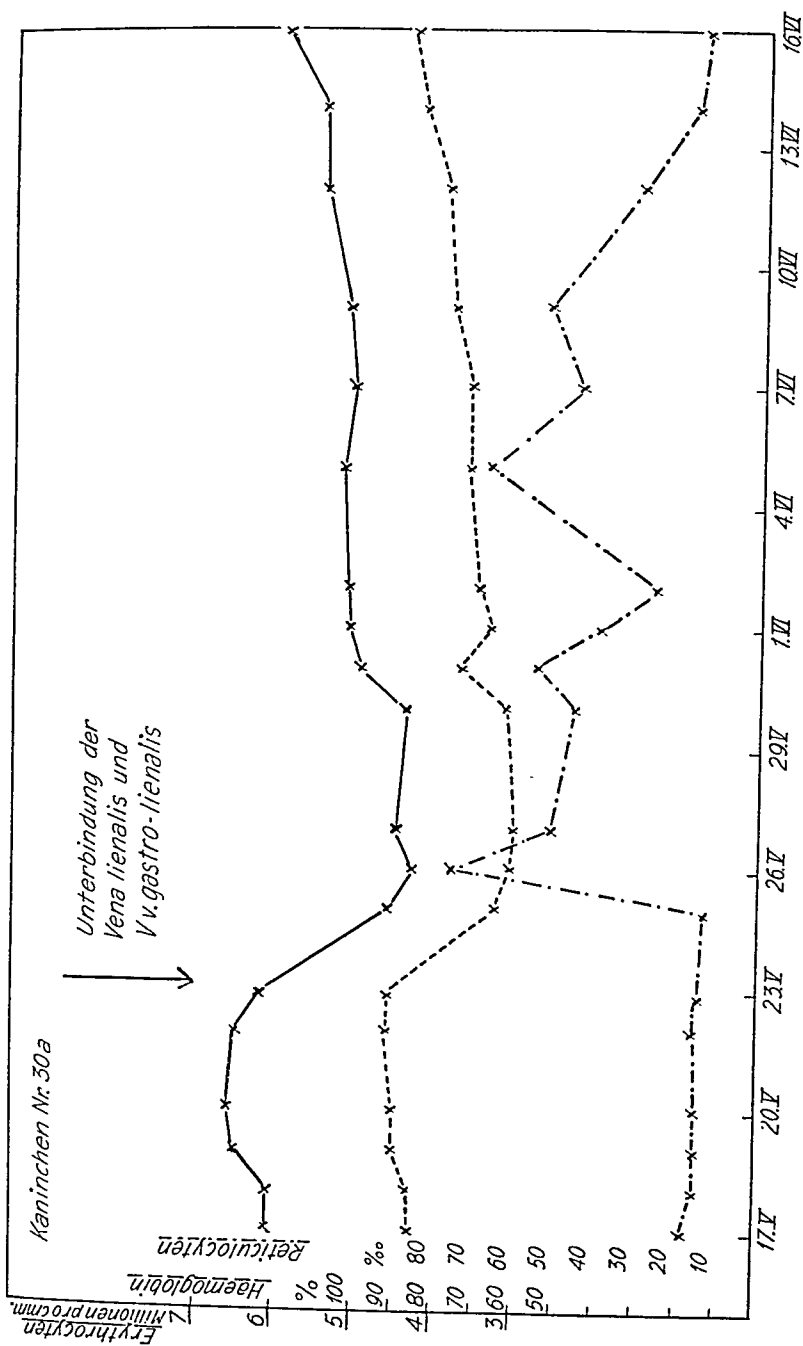


Abbildung Nr. 2.

Kaninchen. Erythrocyten-, Haemoglobin- und Reticulocyten-Gehalt des Blutes aus der Ohrvene, vor und während 24 Tagen nach Unterbindung der V. lienalis und der gastro-lienalen Venen (Vv. gastro-epiploicae).

*Sektionsbefunde:* Von den beiden anaemisch gewordenen Kaninchen hatte 6 bzw. 9 Monate nach der Operation das eine eine deutlich vergrösserte Milz (10,0 mal 1,5 mal 1,0 cm), das andere eine verkleinerte (2,5 mal 0,5 mal 0,5 cm). Bei den übrigen Versuchstieren war die Milz teils mässig vergrössert, teils verkleinert. An den übrigen Organen keine besonderen Veränderungen.

2) Nach *Unterbindung der V. lienalis und gleichzeitig der venösen Verbindungen zwischen Magen und Milz (Vv. gastroepiploicae)* kam es bei allen Versuchstieren (6 Kaninchen, 1 Hund) am 3. bis 5. Tage nach dem Eingriff zu einer mässigen Anaemie. Der Haemoglobingehalt sank um 10 %, bei zwei Kaninchen um 20 bis 30 %. Die Zahl der Erythrocyten im cmm nahm gleichzeitig um 1 bis 2 Millionen ab. Etwa 1 Woche später erhöhte sich die Zahl der Reticulocyten im strömenden Blut auf 50 bis 80 pro Mille. Bald darauf begannen die Haemoglobin- und Erythrocyten-Werte wieder anzusteigen und erreichten nach etwa 2 bis 3 Wochen spontan das normale Niveau, das dann von allen Blutbestandteilen konstant gehalten wird (s. Abb. 2). Die Leukocytenzahlen blieben gleichzeitig z. T. unverändert, z. T. stiegen sie vorübergehend auf 10000 bis 12000 pro cmm an, unter relativer Verminderung des Lymphocytengehaltes im Differentialblutbild der Kaninchen. Diese haben bekanntlich normalerweise 60 bis 80 % Lymphocyten. Occultes Blut im Stuhl wurde niemals beobachtet. Bei zwei dieser Kaninchen wurde 2 bzw. 4 Monate später in einer zweiten Operation die V. coronaria ventriculi unterbunden (s. unten).

*Sektions- bzw. operative Inspektionsbefunde:* Während der Unterbindung der V. lienalis verfärbte sich die Milz bläulich-cyanotisch, wenn sie vorher hellrot war. Ihr Volumen nahm aber bei den Kaninchen nur wenig zu, etwas mehr beim Hund, bisweilen traten Unregelmässigkeiten der Oberfläche auf (Kontraktionen). Die Unterbindung der venösen Gefässe zwischen Magen und Milz bewirkte regelmässig starke bläulich-cyanotische Verfärbung der Magenwand, besonders in ihren vorderen und oberen Teilen. Die Venen an der Magenoberfläche waren deutlich gestaut. Die Stromrichtung in diesen Venen führt also, wie auch Abklemmungsversuche bei den Operationen eindeutig zeigten, stets vom Magen zur Milz. Tiere,

die während des operativen Eingriffes starben, deren Blutveränderungen also in dieser Serie nicht berücksichtigt werden konnten, zeigten, dass sich die Cyanose der Magenwand auch auf die Schleimhaut im Fundus erstreckt. Vereinzelt waren hier auch kapilläre Blutungen in der Schleimhaut wahrnehmbar. Blass und nicht gestaut war dagegen stets die pylorische Region. — 2 bis 4 Monate nach der Operation war bei 4 der überlebenden Kaninchen die Milz entweder vollkommen geschwunden oder auf einen kleinen atrophischen Rest reduziert (0,1 mal 0,5 mal 0,1 cm; 1,5 mal 0,5 mal 0,3 cm). Bei einem weiteren Kaninchen war die Milz stark verkleinert (3,0 mal 1,5 mal 0,5 cm). Nur bei einem Kaninchen wurde das Organ gegenüber dem voroperativen Zustand vergrößert gefunden (10,0 mal 1,5 mal 0,5 cm). Bei diesem Tier war die Milz in ihrer ganzen Länge mit dem Magen bindegewebig fest verwachsen, ausserdem bestanden Adhaesionen zu Dünn- und Dickdarmschlingen. Zwischen Magen und Milz wurden zwei kleine venöse Gefässe gefunden. Vom unteren Milzpol zog eine starke Vene zur Pfortader. Es liess sich natürlich nicht entscheiden, ob diese zweite Milzvene sich erst nach der Operation stärker ausgebildet hatte oder ob sie bereits vorher als accessorischer Ast in gleicher Stärke vorhanden war. Jedenfalls muss in dieser bestehengebliebenen venösen Verbindung die Ursache dafür gesehen werden, dass es im Gegensatz zu allen übrigen Tieren der Serie hier nicht zu atrophischen Veränderungen der Milz kam. Es sei bemerkt, dass dieses Kaninchen gleichzeitig die schwächste Anaemie in dieser Serie zeigte. Im übrigen fanden sich ausser bindegewebigen Verwachsungen mit dem Magen und den Nachbarorganen bei keinem der Tiere wesentliche Veränderungen an den anderen Organen.

3) Nach *Unterbindung der grossen Magenvene (V. coronaria ventriculi)* unterhalb der kleinen Kurvatur, vor ihrer Vereinigung mit der Milzvene, wurden alle (5) Kaninchen anaemisch. 2 bis 3 Tage nach dem Eingriff begann der Haemoglobin-Gehalt des Blutes um 10 % zu sinken, und nahm während der nächsten 2 Wochen noch weiter stark ab, um 20 bis 40 %. Die Zahl der Erythrocyten im cmm verminderte sich gleichzeitig um 1 bis 2,5 Millionen. Diese anaemischen Zustände hielten weit länger an, als bei den Versuchstieren der ersten beiden Serien. Erst nach 3 bis 4 Wochen ging die Anaemie spontan wieder zurück und die Blutwerte erreichten allmählich das Ausgangsniveau. Nach Erreichen der tiefsten Haemoglobin- und Erythrocyten-Werte vermehrte sich die

Zahl der Reticulocyten im strömenden Blut vorübergehend auf 70 bis 120 pro Mille. Dieser Reticulocytenanstieg leitet regelmässig den Rückgang der Anaemie ein (s. Abb. 3). Der Leukocytengehalt des Blutes nahm bei den meisten Tieren in der 1. Woche nach der Operation für kurze Zeit zu, unter gleichzeitiger Vermehrung der neutrophilen, besonders der jugendlichen stabkernigen Elemente und relativer Verminderung der Lymphocyten im Differentialblutbild. Das weisse Blutbild wurde in der 2. Woche (also noch bei bestehender Anaemie) wieder normal. Leukopenie wurde nie beobachtet. Occultes Blut in den Faeces fand sich nur bei einem Kaninchen am 3. und 4. Tage nach der Operation, sonst niemals.

Während bei 4 dieser Kaninchen die Operation als erster Eingriff ausgeführt wurde, wurde bei dem 5. Tier die Magenvene unterbunden, nachdem 2 Monate vorher die V. lienalis und die gastro-lienalen Venen unterbrochen worden waren (Serie 2). Infolge dieses Eingriffes war die Milz auf einen atrophischen Rest reduziert. Bei diesem Tier war 1 Woche nach der Unterbindung der Magenvene der Haemoglobingehalt des Blutes auf 42 %, die Zahl der Erythrocyten pro cmm auf 3,2 Millionen gesunken. Diese hochgradige Anaemie blieb während der nächsten 10 Tage fast unverändert. Dann stieg die Zahl der Reticulocyten vorübergehend auf 138 pro Mille, und in der 3. postoperativen Woche begannen die Haemoglobin- und Erythrocyten-Werte wieder langsam zuzunehmen, erreichten aber erst nach 6 Wochen ihre Ausgangswerte. Der Leukocytengehalt war auch bei diesem Tier vorübergehend vermehrt. Im Ausstrich fanden sich zur Zeit der stärksten Anaemie Polychromasie und leichte Anisocytose. Streng genommen gehört dieses Versuchstier mit seiner besonders schweren und langdauernden Anaemie bereits zu der nächsten Serie, da seine gastro-lienalen Venen infolge des ersten Eingriffes nicht intakt waren; die Unterbindung der V. coronaria ventriculi bewirkte also bei ihm eine weit massivere Blockierung des venösen Blutabflusses vom Magen, als bei den anderen 4 Kaninchen.

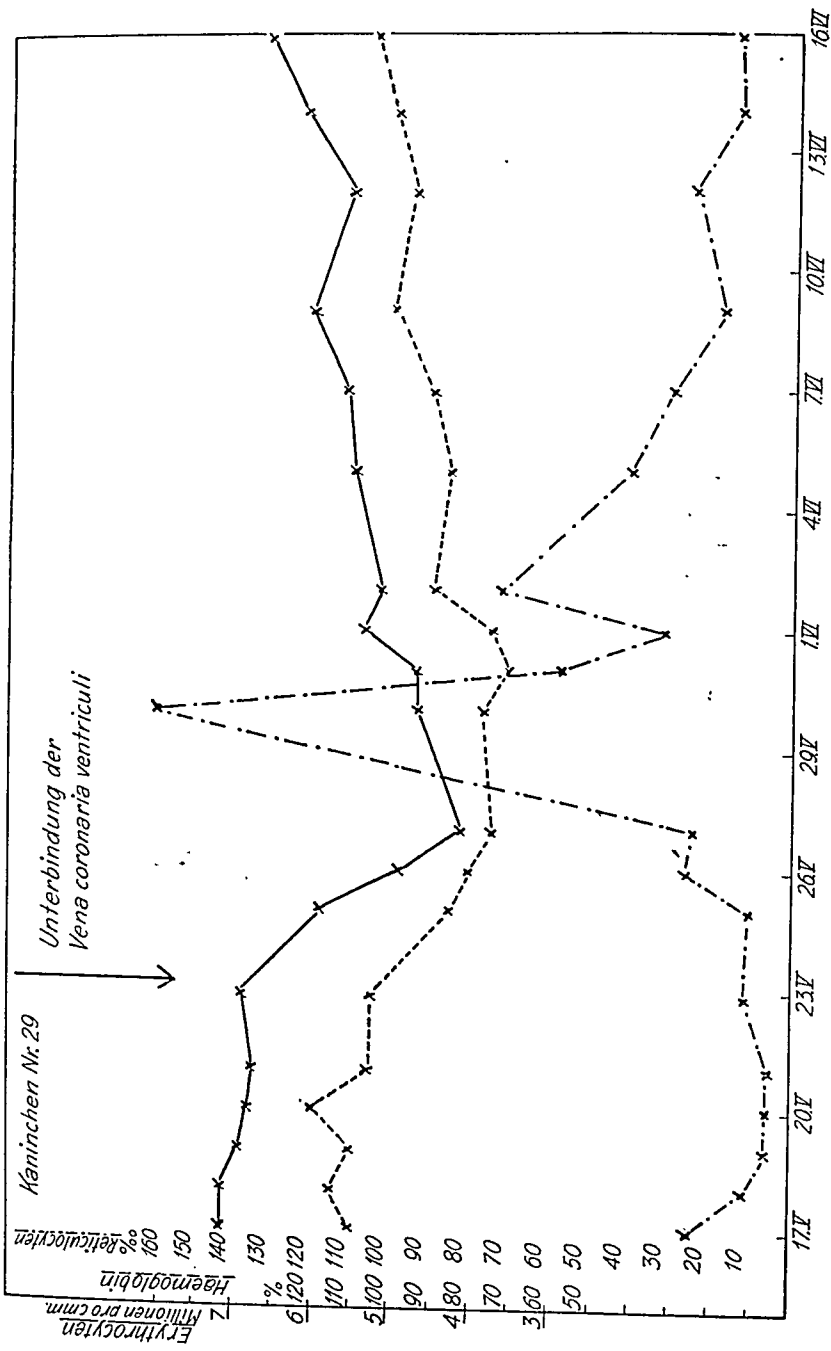


Abbildung Nr. 3.

Kaninchen. Erythrocyten-, Haemoglobin- und Reticulocyten-Gehalt des Blutes aus der Ohrvene, vor und während 24 Tagen nach Unterbindung der V. coronaria ventriculi.



*Sektions- bzw. operative Inspektionsbefunde:* Die Unterbindung der Magenvene bewirkte bei allen Operationen sofort eine Stauung aller sichtbaren Venen am Magen und blau-cyanotische Verfärbung der Magenwand, von der jedoch die pylorische Region ausgenommen blieb. Bei einigen Tieren, die in den ersten 24 bis 48 Stunden nach der Operation starben, deren Blutveränderungen also nicht beobachtet werden konnten, zeigte sich, dass diese cyanotische Verfärbung sich auf alle Schichten der Magenwand erstreckt. Vereinzelt konnten auch Stauungsblutungen in der Muscularis und Mucosa des Magens gefunden werden. Eine grosse Magenblutung wurde nur bei einem während der Operation gestorbenen Kaninchen beobachtet. Bei den lange überlebenden Tieren aber kann, wie die Stuhluntersuchung ergab, nicht mit nennenswerten Blutungen in den Magen gerechnet werden. — 2 dieser Kaninchen starben nach 1 bzw. 10 Monaten an akuten Infekten der Atmungsorgane. 2 weitere Tiere starben nach etwa 1 Jahr bei einem zweiten operativen Eingriff. Bei 1 Kaninchen wurde nach 4 Monaten die V. lienalis und die gastrolienalen Venen unterbunden (Serie 2). Übereinstimmend zeigten alle diese Tiere reichlich narbiges Bindegewebe an der Unterbindungsstelle. In diesem fand sich stets ein dünnes venöses Gefäss, das für Blut vom Magen zur Pfortader durchgängig war, entweder eine neu gebildete Kollateralvene oder die revascularisierte V. coronaria ventriculi. Die gastro-lienalen Venen waren stets erweitert. Die Milz nur bei den beiden Infekttieren vergrößert (Pulpaschwellung), sonst immer normal. Am Magen bei 2 Tieren gastritische Veränderungen, sonstige Organe ohne pathologische Befunde.

4) Nach *Unterbindung der V. coronaria ventriculi und gleichzeitig aller venöser Verbindungen zwischen Magen und Milz* wurden alle Versuchstiere (7 Kaninchen, 2 Hunde) stark anaemisch. Die Anaemie begann 2 bis 4 Tage nach der Operation, bei den Hunden nach einer anfänglichen kurzdauernden Erhöhung der Haemoglobin- und Erythrocyten-Werte (Bluteindickung infolge Schockwirkung). Diese Anaemie war meist hochgradiger als die nach Unterbindung der V. coronaria ventriculi allein (Serie 3). Der Haemoglobingehalt verminderte sich um 20 bis 40 %, die Zahl der Erythrocyten um 1 bis 2,5 Millionen pro cmm. Auch bei allen diesen Tieren kam es bei den tiefsten Haemoglobin- und Erythrocyten-Werten, in der 2. bis 4. postoperativen Woche, zu einer Ausschwemmung von Reticulocyten in das strömende Blut. Diese

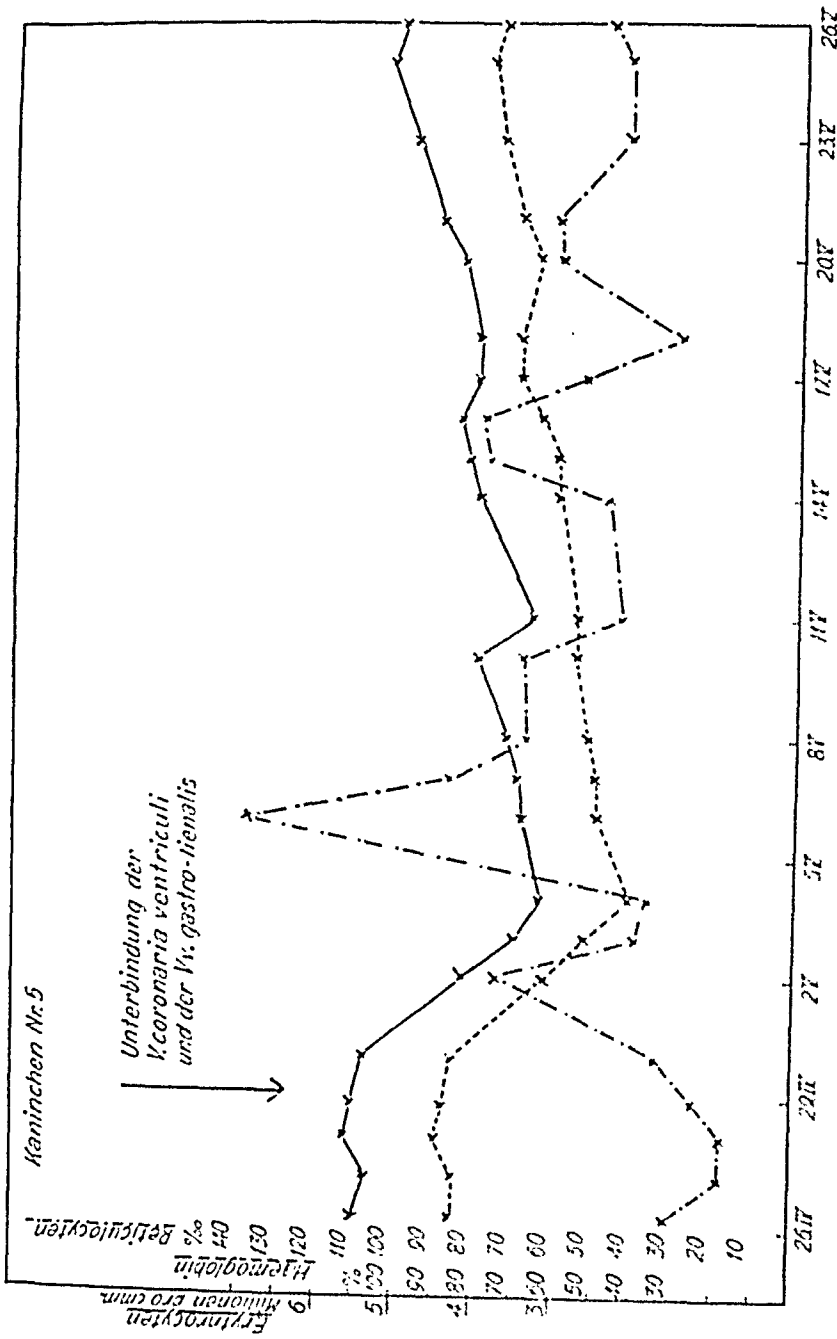


Abbildung Nr. 5.

Kaninchen. Erythrocyten-, Haemoglobin- und Reticulocyten-Gehalt des Blutes aus der Ohrvene, vor und während 27 Tagen nach Unterbindung der V. coronaria ventriculi und der gastro-lienales Venen (Vv. gastro-epiploicae).

nahmen auf 40 bis 80 pro Mille, an einzelnen Tagen bis auf über 100 pro Mille zu. Ihre Vermehrung leitet den Rückgang der Anaemie ein. Mit dem allmählichen Wiederanstieg von Haemoglobin und Erythrocyten bis auf des normale Ausgangsniveau wird auch die Reticulocytenzahl stets normal (s. Abb. 4). Die Leukocytenzahl nahm in der 1. Woche nach der Operation meist vorübergehend zu, unter Verminderung der relativen Lymphocytose der Kaninchen, mit starker Vermehrung jugendlicher neutrophiler Leukocyten besonders bei den Hunden. Im Blutaussstrich der Tiere mit den stärksten Anaemien (absoluter Haemoglobingehalt des Blutes 50 % oder weniger) fanden sich Polychromasie, leichte Anisocytose, vereinzelt Normoblasten. Occultes Blut in den Faeces nur bei einem Kaninchen am 3. Tage nach der Operation, sonst niemals.

Diese Operation wurde bei 6 Kaninchen und 2 Hunden als erster Eingriff ausgeführt, bei dem 7. Kaninchen waren 4 Monate vorher die V. lienalis und die gastro-lienalen Venen unterbunden worden (Serie 2). Die Milz war infolgedessen auf einen kleinen atrophischen Rest reduziert, zu dem zwei neue Venen vom Magen zogen. Die Blutveränderungen dieses Tieres sind besonders aufschlussreich. Nach dem *ersten Eingriff*, bei dem die V. lienalis und die gastro-lienalen Venen unterbunden wurden (wobei also nur deren Anteil des venösen Blutabstromes vom Magen blockiert wurde), sank in der 1. Woche der Haemoglobingehalt des Blutes auf 60 %, die Zahl der Erythrocyten auf etwa 4 Millionen pro cmm. Nach einem Anstieg der Reticulocyten auf 50 bis 70 pro Mille ging die Anaemie in der 2. postoperativen Woche zurück, um nach 3 Wochen wieder das Ausgangsniveau zu erreichen (s. Abb. 2). Jetzt nach dem *zweiten Eingriff*, bei dem alle venösen Abflussbahnen des Magens unterbrochen wurden (die V. coronaria ventriculi und die beiden neuen Venen zum Milzrest), sanken die Haemoglobinwerte in der 2. Woche auf 40 %, die Erythrocytenzahl auf 3 Millionen pro cmm. Noch 3 Wochen nach der Operation betrug der Haemoglobingehalt 50 %, die Zahl der Erythrocyten pro cmm 3,8 Millionen. Die Zahl der Reticulocyten

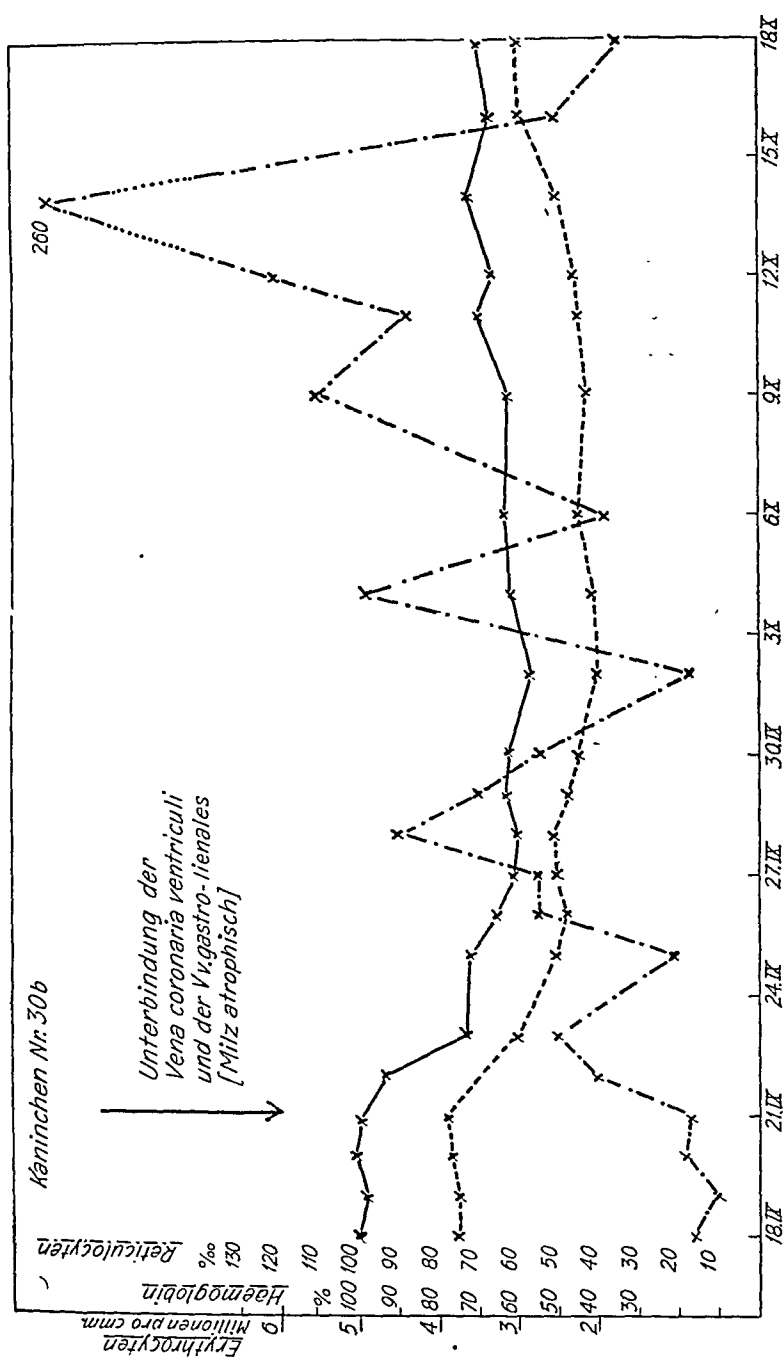


Abbildung Nr. 5.

Kaninchen (gleiches Tier wie in Abb. 2). Erythrocyten-, Haemoglobin- und Reticulocyten-Gehalt des Blutes aus der Ohrvene, vor und während 27 Tagen nach Unterbindung der V. coronaria ventriculi und aller gastro-lienalen Venen. Die Milz des Tieres war infolge der 4 Monate vorher ausgeführten Unterbindung der V. lienalis und der Vv. gastro-epiploicae atrophisch. Für den Effekt der ersten Operation vergl. Abbildung 2.

im strömenden Blut stieg jetzt stark an, wiederholt auf mehr als 100 pro Mille, einmal sogar auf den ausserordentlichen Wert von 260 pro Mille. Erst in der 4. postoperativen Woche ging die Anaemie langsam zurück. Die normalen Ausgangswerte wurden erst nach 10 Wochen wieder erreicht (s. Abb. 5). Die Anaemie war also jetzt viel stärker und hielt weit länger an.

*Sektions- bzw. operative Inspektionsbefunde:* Die Unterbrechung aller venösen Abflüsse vom Magen bewirkte bei allen Operationen naturgemäss eine starke Stauung in allen am Magen sichtbaren Venen, sowie eine blau-cyanotische Verfärbung der Vorder- und Hinterwand des Magens, mit Ausnahme der pylorischen Region. Auch in dieser Serie zeigten Tiere, die in den ersten 24 bis 48 Stunden nach der Operation starben, die Cyanose der Muscularis und Mucosa, vereinzelt mit Stauungsblutungen in diesen Schichten. Zwei während der Operation gestorbene Kaninchen hatten eine grosse Magenblutung. Bei den lange überlebenden Tieren war aber nicht mit nennenswerten Blutungen in den Magen zu rechnen, wie der negative Ausfall der Stuhluntersuchungen zeigte. — 2 dieser Kaninchen starben nach 6 bzw. 10½ Monaten an Pneumonie. 3 Kaninchen starben bei Ausführung eines zweiten Eingriffes. Bei dem 6. Kaninchen wurde nach 8½ Monaten die Milz extirpiert und bei dieser Gelegenheit die Inspektion vorgenommen. Das 7. Kaninchen wurde nach 1½ Jahren getötet. Die 2 Hunde wurden 6 bzw. 12 Monate später einem zweiten Eingriff unterzogen. Bei allen Tieren zeigte sich übereinstimmend: Im narbigen Bindegewebe an der Unterbindungsstelle, von dem aus sich Adhaesionen zwischen Magen, Milz, Netz und Dünndarmschlingen entwickelt hatten, fanden sich regelmässig eine oder mehrere kollaterale Venen. Teils lag lateral von der alten V. coronaria ventriculi ein neues dünnes Gefäss, teils war die Magenvene wieder revascularisiert. Auch zwischen Magen und Milz wurden neue bzw. revascularisierte Venen gefunden, die bei den Hunden besonders stark ausgebildet waren. Die Grösse und der Umfang dieser Bahnen, durch die der Blutabstrom des Magens erfolgte, richtete sich nach

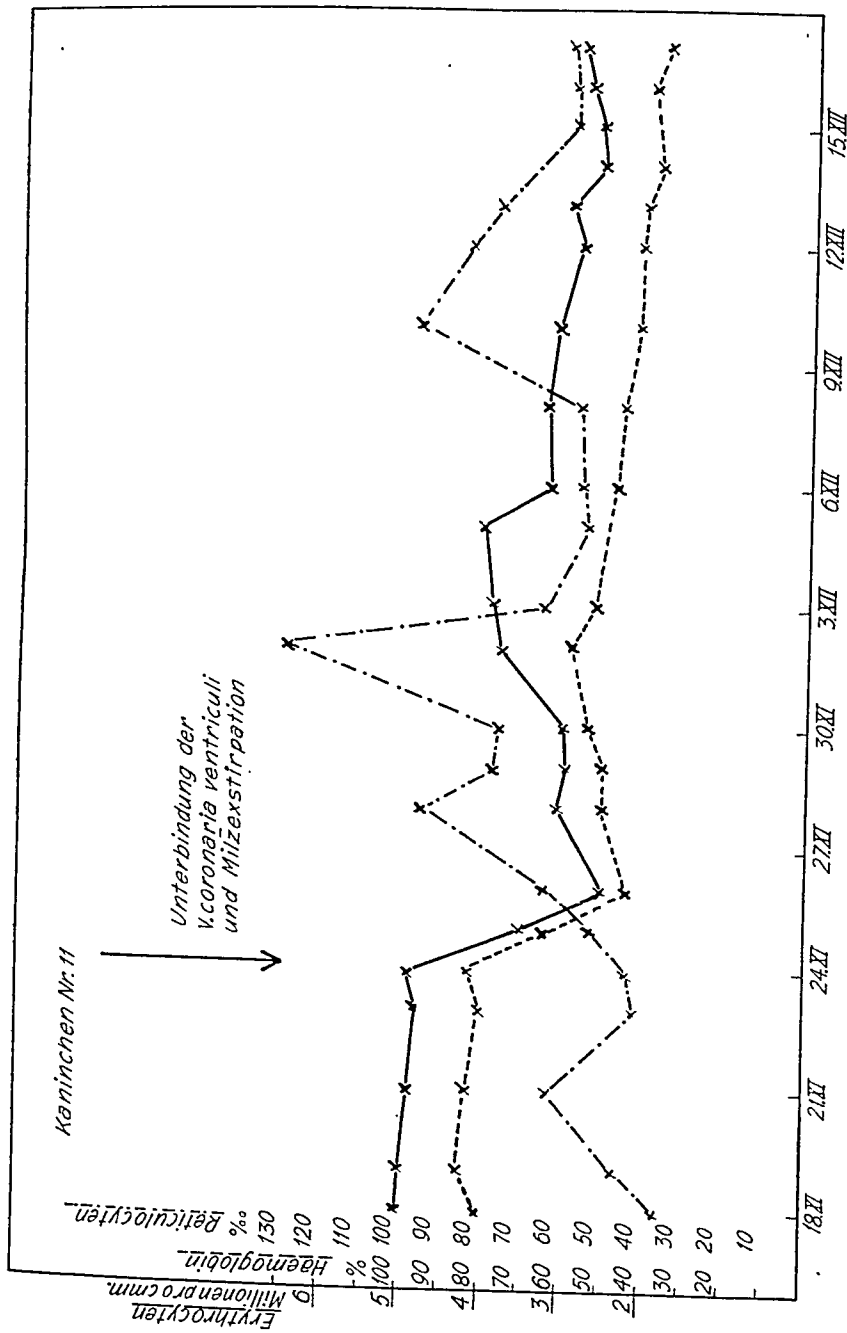


Abbildung Nr. 6.

Kaninchen. Erythrocyten-, Haemoglobin- und Reticulocyten-Gehalt des Blutes aus der Ohrvene, vor und während 24 Tagen nach Unterbindung der V. coronaria ventriculi und gleichzeitiger Exstirpation der Milz.

der Zeitdauer, die seit der Operation vergangen war. Bei Kaninchen liess sich feststellen, dass *das Auftreten dieser kolateralen venösen Bahnen für den Abstrom des Blutes vom Magen zeitlich mit der starken Vermehrung der Reticulocyten im strömenden Blut zusammenfiel*. Die Magenwand war nur in den ersten Wochen gestaut, bläulich-cyanotisch. Die Milz war nur bei den beiden Infekt-Kaninchen vergrössert, sonst stets normal. Auch an den übrigen Organen, insbesondere am Knochenmark, keine besonderen Veränderungen.

5) Wurde *gleichzeitig mit der Unterbindung der V. coronaria ventriculi die Milz exstirpiert*, nachdem unter Vermeidung von Blutungen alle arteriellen und venösen Gefässe dieses Organes doppelt unterbunden und durchschnitten worden waren, so begann bei allen 5 Kaninchen nach 2 bis 4 Tagen der Haemoglobingehalt des Blutes und die Zahl der Erythrocyten abzunehmen. Die Dauer dieser Anaemien betrug stets mindestens 4 bis 6 Wochen. Ihr Ausmaass war bei den verschiedenen Tieren nicht gleichmässig. Bei 3 Kaninchen sanken die Haemoglobin-Werte um 10 bis 20 %, die Zahl der Erythrocyten um 1 bis 1,5 Millionen pro cmm. Sobald die Anaemie ihr Maximum erreichte, kam es auch bei diesen Tieren zu einer Vermehrung der Reticulocyten im strömenden Blut, auf 40 bis 80 pro Mille. Die Leukocytenzahl und das Differentialblutbild veränderten sich nicht. — Bei 2 anderen Kaninchen war die Anaemie nicht nur besonders langdauernd, sondern auch sehr hochgradig. Hier sank bei dem einen (Kaninchen Nr. 11) bereits am 2. postoperativen Tage der Haemoglobingehalt des Blutes auf 45 %, die Zahl der Erythrocyten auf 2,6 Millionen im cmm ab. Während der folgenden 10 Tage wurden Haemoglobin-Werte zwischen 50 und 55 %, Erythrocytenzahlen von 3 bis 3,5 Millionen gefunden. Die Zahl der Reticulocyten im strömenden Blut stieg gleichzeitig auf 80 bis 130 pro Mille. Von der 3. postoperativen Woche an sank der Haemoglobin- und Erythrocyten-Gehalt des Blutes erneut, schliesslich bis auf 36 % Haemoglobin und 2,9 Millionen Erythrocyten pro cmm. Die Zahl der Reticulocyten schwankte in dieser Zeit zwischen 58 und 98 pro Mille (s. Abb. 6). Die Leukocytenzahl

blieb nach der Operation zunächst unverändert. Von der 3. postoperativen Woche an nahm die Zahl der Leukocyten ab, zunächst auf 4500, zuletzt auf 3200 pro cmm. Das Differentialblutbild blieb dabei unverändert. Im Blutaussstrich Polychromasie, Anisocytose und vereinzelt Normoblasten. Bei schlechtem Allgemeinzustand wurde das schwer anaemische Tier am 25. Tage durch Nackenschlag getötet. Bei dem zweiten dieser Tiere ging die postoperative Anaemie zunächst nach etwa 6 Wochen spontan zurück, und die Ausgangswerte für Haemoglobin und Erythrocyten wurden wieder erreicht. 7 Monate später entwickelte sich spontan von neuem ein schwerer anaemischer Zustand. Der Haemoglobingehalt des Blutes sank auf 55 %, die Zahl der Erythrocyten auf 3,8 bis 4 Millionen. Etwa 2 Wochen später nahm die Zahl der Reticulocyten im strömenden Blut vorübergehend auf 129 pro Mille zu, sank aber bald wieder, bis auf 10 pro Mille oder weniger. Die Leukocytenzahl verminderte sich gleichzeitig zunächst auf 5000, zuletzt auf 3500 pro cmm, unter relativer Verminderung der Lymphocyten im Differentialblutbild. Nach 3 Monate lang bestehender Anaemie starb das Tier an einer Pneumonie. — Occultes Blut im Stuhl war bei keinem der 5 Kaninchen nachweisbar. Die Operation wurde bei 4 Tieren als erster Eingriff ausgeführt, bei dem 5., nachdem 8 Monate vorher die V. coronaria ventriculi und die gastro-lienalen Venen unterbunden worden waren (Serie 4). An den Unterbindungsstellen der ersten Operation hatten sich hier, wie stets, dünne neue Venen geöffnet, die jetzt unterbunden wurden.

*Sektionsbefunde:* 2 Kaninchen starben an Pneumonie, nach 6 Wochen bzw. 10 Monaten. 3 Tiere wurden nach 24 Tagen, nach 6 bzw. 12 Wochen getötet. Bei allen diesen Kaninchen hatten sich, wie auch bei den Tieren von Serie 3 und 4 beobachtet, im narbigen Bindegewebe der Unterbindungsstellen oder in den Adhaesionssträngen zum Netz bzw. Dünndarm eine oder mehrere dünne venöse Gefässe wieder dem Blutstrom vom Magen geöffnet. Ihre Zahl und ihre Weite war umso grösser, je längere Zeit seit dem Eingriff vergangen war. Der Magen war bei den am frühesten nach der Operation getöteten bzw. gestorbenen Tieren noch gestaut, blau-cyanotisch verfärbt, zeigte aber keine Blutungen oder Epitheldefekte.



Später war die Magenschleimhaut ausgesprochen blass. Die Pfortader war stets mit flüssigem Blut gefüllt, frei von Thromben. Bei den beiden Kaninchen mit den schwersten Anaemien war das subcutane Fettpolster stark reduziert. Das Faltenrelief der Magenschleimhaut war bei ihnen auffallend gering. Die Röhrenknochen und das Sternum enthielten rotes Knochenmark.

6) Nach *Unterbindung der V. mesenterica superior*, die als Kontrollversuch ausgeführt wurde, starben die meisten Tiere bei oder in den ersten 24 Stunden nach dem Eingriff. Es gelang aber 3 Kaninchen 8 bzw. 10 Tage am Leben zu erhalten. Sie wurden in dieser Zeit nicht anaemisch, im Gegenteil, der Haemoglobin- und Erythrocyten-Gehalt des Blutes stieg etwas an. Die Zahl der Reticulocyten im strömenden Blut blieb unverändert niedrig. Der Leukocytengehalt nahm zu, unter Vermehrung der jugendlichen neutrophilen Elemente, bei relativer Verminderung der Lymphocyten. Occultes Blut in den Faeces bei 2 Kaninchen am 3. bis 5. Tage nach dem Eingriff.

*Sektionsbefunde:* Thrombose in der unterbundenen V. mesenterica superior. Venen im Zuflussgebiet des thrombosierten Gefässes stark gestaut. Die zugehörigen Dünndarmschlingen stark gebläht, ihre Wand blass-cyanotisch. V. portae frei durchgängig, nicht thrombosiert. An der Oberfläche des Dün- und Dickdarms einzelne Fibrinbeläge. Kein Exsudat in der Bauchhöhle. Magen stark mit Luft gefüllt, blass. Schleimhaut mit gastritischen Veränderungen und einzelnen Blutaustritten. Todesursache: postoperative Magen- und Darmatonie mit beginnender Peritonitis.

### *Diskussion der Versuchsergebnisse.*

Aus den Beobachtungen bei den verschiedenen operativen Eingriffen geht hervor, dass ein Teil des venösen Blutes vom Magen seinen Weg durch die Venen der Magenwand nimmt, die sich zu der V. coronaria ventriculi sammeln. Diese grosse Magenvene verlässt beim Kaninchen und beim Hund die Magenwand an der kleinen Kurvatur etwas oberhalb des Pylorus und zieht zur V. portae. Etwa 1 cm vor ihrem Eintritt in die Pfortader vereinigt sie sich häufig mit der V. lienalis. Ein

anderer Teil des venösen Blutes vom Magen fliesst durch die, in der Regel drei, venösen Verbindungen zwischen Magen und Milz. Diese Venen (Vv. gastro-epiploicae) entspringen an der grossen Kurvatur des Magens, meist am Fundus, und ziehen im Netz zum Hilus der Milz, wo sie in die V. lienalis einmünden. Dass die Stromrichtung in diesen gastro-lienalen Venen ausschliesslich vom Magen zur Milz führt, geht aus ihrem Verhalten bei Abklemmung bezw. Unterbindung eindeutig hervor. Der von Bock u. Frenzel einmal geäusserten Meinung, bei Unterbindung der V. lienalis könnte das Milzblut über diese gastro-lienalen Venen abströmen und auf dem Umweg über die Magen- und Oesophagusvenen zur V. cava gelangen, muss also widersprochen werden. Eine oder mehrere der genannten Vv. gastro-epiploicae erreichen übrigens bisweilen — ähnlich dem Verhalten beim Menschen — auch bei diesen Versuchstieren die V. lienalis etwa in der Mitte zwischen Milzhilus und Einmündung der Milzvene in die V. portae. Die V. lienalis ihrerseits kann sich manchmal vor ihrer Einmündung in die Pfortader statt mit der V. coronaria ventriculi mit der V. mesenterica superior vereinigen.

Aus diesen anatomischen Verhältnissen folgt für die Bewertung der Versuchsergebnisse: Die Unterbindung bezw. Thrombosierung der V. lienalis (»isolierte Milzvenenthrombose«, Serie 1) bedeutet nicht nur eine Stauung der Milz, ein Abflusshindernis für das Milzblut zur Pfortader, sondern behindert sekundär auch einen Teil der venösen Zirkulation des Magens durch die Vv. gastro-epiploicae. Noch sicherer wird dieser Effekt, eine partielle venöse Blockade des Magens, durch die gleichzeitige Unterbindung der gastro-lienalen Venen und der V. lienalis erreicht (Serie 2). Der Abstrom des venösen Blutes vom Magen zur Pfortader durch die V. coronaria ventriculi bleibt hierbei natürlich unbehindert. Bei Unterbindung der V. coronaria ventriculi allein (Serie 3) wird ein grösserer Teil des Magenblutes am Abstrom in die Pfortader gehindert. Einem Teil dieses Blutes bleibt aber der Weg über die gastro-lienalen Venen offen. Eine totale Zirkulationsunterbrechung für das venöse Blut des Magens auf seinem

Weg in die *V. portae* entsteht nur dann, wenn gleichzeitig mit der Unterbindung der *V. coronaria ventriculi* alle gastro-lienalen Venen unterbunden werden (Serie 4), sowie bei den Tieren, deren Milz gleichzeitig mit der Unterbrechung der grossen Magenvene exstirpiert wird (Serie 5). Bei den Versuchstieren der Serien 3 und 4 gelangt das Milzblut unbehindert in die Pfortader. Bei Unterbindung der *V. mesenterica superior* (Serie 6) bleibt der venöse Blutabstrom des Magens und der Milz zur *V. portae* unbehindert.

Betrachten wir den Einfluss dieser verschiedenen Eingriffe auf den Haemoglobin- und Erythrocyten-Gehalt des Blutes, so zeigt sich, dass die Unterbindung der *V. mesenterica superior* niemals anaemisierend wirkt. Die isolierte Thrombosierung der *V. lienalis* lässt bei etwa der Hälfte der Versuchstiere ebenfalls jeden anaemisierenden Effekt vermissen. Der Rest wird nach diesem Eingriff vorübergehend leicht anaemisch. Alle übrigen Operationen bewirken regelmässig Anaemien. Ihr Grad und ihre Dauer steht in bestimmten Beziehungen zu der besonderen Art der Eingriffe. Die schwersten Anaemien finden sich bei den Tieren, bei denen in einer oder zwei Operationen eine maximale Blockierung des venösen Blutstromes vom Magen zur Pfortader bewirkt wurde, so beispielsweise bei den Kaninchen Nr. 11, 30 und 33. Es macht keinen Unterschied, ob diese Unterbrechung der venösen Zirkulation durch die Unterbindung der *V. coronaria ventriculi* und gleichzeitig aller gastro-lienalen Venen, wie in Serie 4, oder durch die Kombination der Unterbindung der grossen Magenvene mit der Exstirpation der Milz, wie in Serie 5, erreicht wird, oder ob etwa die Milz durch einen früheren Eingriff atrophisch geworden war. Zwischen den beiden Extremen, dem Fehlen jeder Anaemie und den hochgradigsten Anaemien, stehen die Anaemien aller der Tiere, bei denen der Abstrom des venösen Blutes vom Magen zur Pfortader nur partiell blockiert wurde. Hier ist meist die Unterbrechung der *V. coronaria ventriculi* wirksamer, als die allein der gastro-lienalen Venen.

Die Entstehung der Anaemien wird in keiner Weise durch die Funktion der Milz beeinflusst. Dies beweisen nicht nur

die Tiere mit Milzexstirpation, die z. T. sehr schwere Anaemien hatten, sondern auch jene Versuchs-Tiere, bei denen die Milz infolge früherer Unterbindung der V. lienalis und gleichzeitig der gastro-lienalen Venen atrophisch geworden war (z. B. Kaninchen Nr. 17, 30 und 33). Diese regressiven Veränderungen der Milz, die als Nebenfund der Versuche konstatiert wurden, können teilweise so erklärt werden, dass es sich bei der Unterbindung der gastro-lienalen Venen beim Kaninchen nicht immer vermeiden lässt, auch einige der benachbarten Arterien zu unterbrechen, wie bei Besprechung der Versuchsanordnung bereits erwähnt wurde. In solchen Fällen würde die Atrophie der Milz den gelegentlich beim Menschen beobachteten regressiven Veränderungen bei Arteriosklerose der Milzarterie entsprechen (Lubarsch). Aber auch bei erhaltener arterieller Zufuhr ist allein durch die venöse Stauung ein Anlass zu der Entstehung dieser Atrophie gegeben (Stauungsatrophie, vergl. Lubarsch). Dies wird deutlich durch den Obduktionsbefund des Kaninchens Nr. 24 illustriert, das nach Unterbindung der V. lienalis und der Vv. gastro-epiploicae statt einer atrophischen eine vergrößerte Milz hatte. Bei diesem Tier wurde eine stark ausgebildete accessorische Milzvene gefunden, die die Verbindung zur Pfortader herstellte, und so eine Stauung der Milz verhinderte. Das Problem, wie im einzelnen unter diesen experimentellen Bedingungen die regressiven Veränderungen der Milz entstehen, könnte die Aufgabe besonderer Untersuchungen sein. In diesem Zusammenhang ist die Atrophie der Milz nur soweit von Bedeutung, als der durch sie bedingte subtotale Ausfall der Milzfunktion ebensowenig wie die Exstirpation des Organes die Entstehung der Anaemien weder verhindert noch begünstigt.

Nur insofern werden die Versuchsergebnisse durch den Ausfall der Milzfunktionen beeinflusst, als es bei den milzlosen Tieren meist längere Zeit dauert, bis die anaemischen Blutveränderungen verschwinden. Auch bei splenektomierten Hunden, die durch Blutgifte anaemisch gemacht wurden, vergeht bis zur Wiederherstellung des normalen Blutbildes weit längere Zeit als bei den Kontrolltieren (Ponticaccia). Die Blu-

lunsanaemien milzloser Menschen sollen, nach Eppinger, Pearce, Krumbhaar, besonders schwer und langdauernd sein. Andere Autoren (Paton, Gulland u. Fowler) vermissen allerdings jeden Unterschied zwischen milzlosen und normalen Versuchstieren in der Regenerationsgeschwindigkeit des Blutes nach Aderlassen. Asher, Vogel u. Sollberger fanden sogar umgekehrt eine Begünstigung der Blutregeneration durch die Milzexstirpation. Aus der menschlichen Pathologie liegen verschiedene, nicht immer bestätigte Erfahrungen darüber vor, dass eine bestehende Anaemie nach Milzexstirpation rasch verschwinden oder sogar eine Polyglobulie auftreten kann (vergl. Hans Hirschfeld). Diese verschiedenen, einander teilweise widersprechenden Beobachtungen lassen nur den Schluss zu, dass die Rolle der Milz für die Blutregeneration offenbar von der Art der Anaemie, von etwaigen gleichzeitigen Veränderungen anderer Organe und wahrscheinlich auch von der Tierspezies bestimmt wird. Für die Anaemien nach experimenteller Thrombosierung der verschiedenen Venen im Pfortadergebiet, wie sie in den Versuchen dieser Arbeit gefunden wurden, ist jedenfalls zu konstatieren, dass die Existenz oder der Ausfall der Milzfunktionen für die Entstehung der anacemischen Zustände bedeutungslos ist, dass aber die Blutregeneration bei milzlosen Tieren offenbar etwas längere Zeit braucht.

In den ersten Wochen nach den operativen Eingriffen, in denen alle venösen Bahnen vom Magen zur Pfortader unterbrochen wurden (Serie 4 und 5), kann der Abstrom des Blutes vom Magen nur über Kollateralvenen zu den Oesophagusvenen und weiter in die V. cava inferior erfolgen. Nach 2 bis 4 Wochen aber werden entweder die unterbundenen Venen allmählich revascularisiert, oder es bilden sich an Stelle der unterbrochenen Gefäße kollaterale Venen aus, durch die wieder Blut vom Magen in die V. portae gelangen kann, wie sich bei operativen Inspektionen bzw. Sektionen zeigte. Zeitlich fällt dies mit der Ausschüttung jugendlicher reticulierter Erythrocyten in die Blutbahn zusammen. Diese »krisenartige« Vermehrung der Reticulocyten leitet den spontanen Rückgang

der Anaemien ein. In weiteren 2 bis 3 Wochen werden wieder die normalen Ausgangswerte für Haemoglobin und Erythrocyten erreicht. Diese Restitution konnte nur bei 2 Tieren der 5. Serie (s. Seite 388—389) nicht beobachtet werden, die noch im anaemischen Zustand starben bzw. getötet wurden. Ist die Anaemie vollkommen verschwunden, so stehen regelmässig dem venösen Blut auch wieder ausreichende Wege vom Magen zur Pfortader offen, sei es durch Revascularisierung der unterbundenen Gefässe, sei es durch neugebildete Kollateralvenen.

Die Versuche zeigen eindeutig, dass nicht die Unterbindung bzw. Thrombosierung *jeder* grösseren Vene im Quellgebiet der Pfortader zu einer Anaemie führt. Der anaemisierende Effekt wird niemals durch die Thrombosierung selbst eines so grossen Gefässes wie der V. mesenterica superior erreicht. Auch die Unterbindung der V. lienalis mit ihren Folgen für die Milz bewirkt nicht regelmässig eine Blutarmut. *Der entscheidende Faktor für die Entstehung der Anaemien ist vielmehr ausschliesslich die partielle oder totale Unterbrechung des venösen Blutstromes vom Magen zur V. portae.* Der Grad der Anaemie steht in einem Verhältnis zu dem Ausmass dieser venösen Blockade: ist die Unterbrechung nur partiell (Vv. gastro-epiploicae allein oder V. coronaria ventriculi allein), so sind die anaemischen Veränderungen geringer, als bei totaler Sperrung aller venösen Wege vom Magen zur Pfortader. Diese Schlussfolgerungen aus den positiven und negativen Versuchsergebnissen finden eine weitere Stütze darin, dass der Rückgang der Anaemie mit der Wiedereröffnung venöser Bahnen zwischen Magen und Pfortader einhergeht.

Dieser Auffassung von der entscheidenden Bedeutung der Zirkulationsunterbrechung ausschliesslich der Venen zwischen Magen und V. portae fügen sich auch gut einige andere Beobachtungen ein, ohne dass sie von ihren Autoren selbst in dieser Weise gedeutet worden wären. Gebhardt u. Fricke fanden bei 4 von 14 Hunden nach Anlegung einer Eck'schen Fistel in der 1. bis 4. postoperativen Woche schwere Anaemien. Bei dieser Operation wird bekanntlich eine Anastomose zwi-

schen V. portae und V. cava inferior hergestellt. Liegt diese Anastomose (wie sie meist angelegt wird) nahe der Leberpforte, so gelangt das venöse Blut des Magens nicht in die Leber, sondern wird an dieser vorbei in die V. cava umgeleitet. Bock u. Frenzel berichteten 1938 — die Untersuchungen dieser Arbeit waren damals schon im Gange — über schwere Anaemien bei 5 Kaninchen nach gleichzeitiger Unterbindung der V. lienalis und V. coronaria ventriculi. Durch diesen Eingriff wird ebenfalls die venöse Zirkulation zwischen Magen und Pfortader total blockiert. Die von Bock u. Frenzel beobachteten Anaemien entsprechen in ihrem Grad ungefähr denen, die von mir nach gleichzeitiger Unterbindung der V. coronaria ventriculi und aller gastrolienalen Venen, bzw. bei gleichzeitiger Milzexstirpation gefunden wurden. Eine Differenz besteht nur bezüglich der zeitlichen Verhältnisse: Das Maximum erreichten die Anaemien bei Bock u. Frenzel in der 5. Woche, das Ausgangsniveau wurde etwa in der 10. Woche wieder erreicht. In meinen mehr als 30 Anaemie bewirkenden Operationen wurden die tiefsten Haemoglobin- und Erythrocytenwerte stets in der 2. bis 3. postoperativen Woche gefunden, auch der Rückgang der Anaemien dauerte selten so lange.

Möglicherweise ist für diese Unterschiede in den Befunden ein methodisch differentes Vorgehen bedeutungsvoller, als der Umstand, dass von Bock u. Frenzel anders als in den hier berichteten Versuchen stets die V. lienalis zusammen mit der V. coronaria ventriculi unterbunden wurde. Die genannten Autoren schreiben nämlich: »Vor jeder Operation wurde ein vollständiger Blutstatus aufgenommen, ein zweiter Blutstatus 14 Tage nach der Operation. Von da an wurden die morphologischen Blutwerte jede Woche geprüft.« Nach meinen Erfahrungen ist eine *einmalige* voroperative Untersuchung der Versuchstiere nicht ausreichend. Bei den ersten zwei bis drei Untersuchungen sind die gefundenen Haemoglobin- und Erythrocytenwerte häufig zu hoch. Dies erklärt sich aus der anfänglich fehlenden Gewöhnung der Kaninchen an den Eingriff der Blutentnahme, der eine Erregung und damit eine Adrenalinausschüttung bewirken kann. Durch letztere werden Erythrocyten aus der Milz und anderen Depotorganen in die Blutbahn ausgeschwemmt. Nur die Ausdehnung der voroperativen Periode auf 8 bis 10 Tage

bei fast täglichen Untersuchungen führt zu zuverlässigen und konstanten Ausgangswerten. Auch in der postoperativen Zeit sind wöchentliche Abstände der Untersuchung zu gross.

Während bezüglich der Haemoglobin- und Erythrocytenwerte zwischen den Beobachtungen von Bock u. Frenzel und den Befunden dieser Arbeit nur unwesentliche quantitative und zeitliche Differenzen bestehen, sind die Resultate über das Verhalten der Reticulocyten vollkommen entgegengesetzt. Bock u. Frenzel fanden bei keinem ihrer 5 Kaninchen eine Vermehrung der Reticulocyten. Es lässt sich nicht entscheiden, ob ihnen etwa infolge zu grosser Untersuchungsabstände eine Reticulocytenkrise entgangen ist, oder ob wahrscheinlicher dieser Unterschied eine andere Ursache hat. Auf der zirkulatorischen Ausschaltung der Milz kann die Differenz nicht beruhen; denn in meinen Versuchen trat die Vermehrung der Reticulocyten im strömenden Blut bei allen Tieren auf, die anaemisch wurden, gleichgültig ob sie eine funktionstüchtige Milz hatten oder nicht.

Was die Leukocyten betrifft, so fanden Bock u. Frenzel stets langdauernde, teilweise bis 35 Wochen anhaltende Verminderung des Gehaltes an Granulocyten im Blut. In den eigenen Versuchen dagegen kam es nur bei 2 Kaninchen der 5. Serie (Unterbindung der V. coronaria ventriculi und Milzextirpation) im terminalen Stadium bei schwerster Anaemie zu einer Leukopenie. Hierbei waren Granulocyten und Lymphocyten ungefähr gleichmässig vermindert. Bei allen übrigen Versuchstieren, auch wenn sie schwer anaemisch wurden, blieb die Zahl der Leukocyten unverändert, oder nahm in der 1. bis 2. postoperativen Woche vorübergehend um einige 1000 Zellen pro cmm zu. Diese Leukocytose ging meist mit einer relativen Verminderung der Lymphocyten im Differentialblutbild einher. Sie entsteht also durch eine Ausschwemmung meist jugendlicher granulocytärer Elemente in die Blutbahn, wobei die absolute Menge der zirkulierenden Lymphocyten annähernd gleich bleibt. Diese leukocytäre Reaktion ist eine unspezifische Folge der operativen Eingriffe und der damit verbundenen Gewebslaesionen. Die besondere



Art der Operation ist für sie bedeutungslos. Sie ist stets bereits wieder abgeklungen, wenn die Haemoglobin- und Erythrocytenwerte erst ihren Tiefpunkt erreichen. Die unmittelbare und spezifische Folge der partiellen oder totalen Unterbrechung des venösen Blutstromes zwischen Magen und Pfortader besteht also ausschliesslich in einer erst nach einigen Tagen einsetzenden, allmählich zunehmenden Verminderung des Haemoglobin- und Erythrocytengehaltes im Blut.

Die eben erwähnten Versuche von Bock u. Frenzel gingen übrigens nicht von der Frage der Entstehung der Anaemien bei Thrombosen im Pfortadergebiet aus, sondern galten den funktionellen Beziehungen zwischen Milz und Knochenmark. Die Autoren deuteten ihre Versuchsergebnisse so, dass die Milz normalerweise einen knochenmarkshemmenden Faktor in die Blutbahn abgäbe, der in der Leber zerstört oder gebunden würde. Infolge der angelegten Ligaturen sollte dieser hypothetische Stoff über die gastro-linealen Venen und kollaterale Bahnen am Magen zu den Oesophagusvenen und somit über die V. cava in erhöhter Konzentration zum Knochenmark gelangen. Durch die hemmende Wirkung des Milzstoffes auf das Knochenmark sollten die Anaemien entstehen. Dass diese Deutung nicht zutreffend ist, wurde durch die in dieser Arbeit geschilderten Versuche bewiesen: 1) In keinem Versuch wurde eine Umkehr der Stromrichtung in den Vv. gastroepiploicae beobachtet, durch die Blut von der Milz zum Magen gelangen könnte. 2) Bei erhaltener Zirkulation in der V. lienalis und Unterbindung allein der V. coronaria ventriculi oder dieser Vene gleichzeitig mit den gastro-lienalen Venen werden die Versuchstiere anaemisch. 3) Auch milzlose Tiere werden in gleicher Weise wie Kaninchen mit funktionierender Milz anaemisch, wenn der venöse Blutstrom zwischen Magen und Pfortader blockiert wird.

Nach Feststellung der Tatsache, dass bei den Versuchstieren eine Anaemie stets dann entsteht, wenn das venöse Blut des Magens partiell oder total an der normalen Passage zur Pfortader und damit zur Leber verhindert wird, bleibt zu erklären, weshalb diese Umleitung des Blutstromes anaemi-

sierend wirkt. Es handelt sich nicht etwa um gewöhnliche Blutungsanaemien, die durch eine Stauung der Magenvenen hervorgerufen würden. Bei den Operationen selbst kam es nie zu nennenswerten Blutverlusten. Grössere Magenblutungen fanden sich nur bei einigen während oder kurz nach dem Eingriff verstorbenen Tieren. Bei den lange überlebenden Kaninchen konnten durch die Untersuchung der Faeces auf occultes Blut Blutungen in den Magen oder Darmkanal ausgeschlossen werden, auch wenn sie schwer anaemisch wurden. Ebenso wenig kommt die Zurückhaltung erheblicher Mengen von Erythrocyten in gestauten Kapillargebieten als Ursache der Anaemien in Frage. Wäre dies der Fall, so müsste, im Gegensatz zu den tatsächlichen Befunden, die Unterbindung der V. mesenterica und die isolierte Milzvenenthrombose mindestens so anaemisierend wirken. Im Kapillarnetz der Darmwand und vor allem in der Milz wären die Vorbedingungen für eine solche Zurückhaltung von Erythrocyten weit mehr gegeben, als in den Kapillaren des Magens. Auch die haemolysierenden Eigenschaften der Milz haben für diese Anaemien keine Bedeutung, da sich kein Unterschied in ihrem Auftreten zwischen milzlosen Tieren und solchen mit funktionierender Milz zeigte.

So bleiben nur zwei mögliche Ursachen zu erörtern:

1) Es könnte eine vermehrte Blutzerstörung stattfinden. Das wesentliche Organ einer solchen vermehrten Haemolyse, die Milz, ist für die Entstehung der Anaemien in diesen Versuchen bedeutungslos, wie wir sahen. Die Sektionsbefunde gaben auch keinen Anhaltspunkt für eine vermehrte Haemolyse an anderen Stellen, etwa in der Leber. Für die Hypothese einer vermehrten Blutzerstörung spricht nichts.

2) Die Anaemien können also nur durch Hemmung der Erythropoese im Knochenmark entstehen. Diese könnte dadurch zu Stande kommen, dass entweder ein besonderer hemmender Faktor wirksam wird, oder dadurch, dass ein für die normale Erythropoese notwendiger Stoff fehlt, bezw. nicht in ausreichender Menge vorhanden ist. Die erstgenannte Annah-

me eines »Hemmungsfaktors« würde eine ganze Reihe von Hilfspthesen notwendig machen: dieser Stoff müsste, im Magen gebildet, normalerweise in der Leber zerstört oder gebunden werden (wie es Bock u. Frenzel für ihren hypothetischen Milzstoff ebenfalls annehmen mussten). Durch die Umleitung der Zirkulation könnte er dann das Knochenmark in erhöhter Konzentration erreichen. Oder aber es müsste etwa ein solcher hemmender Stoff in der Leber gebildet und normalerweise von einem Magenfaktor gebunden werden. Nichts spricht aber für die Existenz derartiger Knochenmarkshemmender Stoffe im Magen oder der Leber. Allein diskutabel bleibt daher die Vorstellung, dass ein für die normale Erythropoese notwendiger Stoff unter diesen experimentellen Bedingungen das Knochenmark nicht in genügenden Mengen erreicht.

Für diese Auffassung sprechen zwei weitere Argumente: die Befunde über das Verhalten der Leukocyten und über das der Reticulocyten. Würde eine hemmende Wirkung auf das Knochenmark ausgeübt, so müsste man erwarten, dass die Anaemien, im Gegensatz zu den Befunden, primär regelmässig mit einer Leukopenie einhergehen würden. Entstehen die Anaemien aber durch ein stoffliches Defizit in der Erythropoese, so kommt es allein zu einer Verminderung der Hämoglobin- und Erythrocytenwerte. Andererseits ist die vermehrte Ausschüttung jugendlicher reticulierter Erythrocyten in die Blutbahn, die »Reticulocytenkrise«, mit der jedesmal der Rückgang der Anaemie beginnt, das Anzeichen eines Reizwirkung auf die Erythropoese im Knochenmark. Ihr Auftreten fällt in diesen Versuchen zeitlich zusammen mit der Wiedereröffnung der vorher experimentell verschlossenen venösen Bahnen zwischen Magen und Leber. Dabei ist der Anstieg der Reticulocyten umso stärker, je hochgradiger die Anaemie ist. Dies Verhalten entspricht ganz den Erfahrungen, die bezüglich der Relation zwischen Stärke der Reticulocytenkrise und Grad der Anaemie von Minot u. a. bei der Leberbehandlung bzw. nach Verabreichung von Antiperniciosaschutzstoff bei Kranken mit perniciosöser Anaemie gemacht wurden. Auch die

Reticulocytenkrisen, die durch die Zufuhr eines Produktes aus »intrinsic« und »extrinsic factor« bei solchen Kranken ausgelöst werden, unterliegen der gleichen Regel (Castle u. Mitarb.). Die nach diesen therapeutischen Maassnahmen bei Kranken mit perniziöser Anaemie einsetzenden Reticulocytenkrisen können nur so gedeutet werden, dass ein antianaemischer Stoff zum Knochenmark gelangt, der vorher fehlte. Ebenso ist die Reticulocytenkrise in den Tierexperimenten dieser Arbeit nur so zu verstehen, dass ein infolge der Unterbrechung des Blutstromes zwischen Magen und Leber fehlender oder nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehender »Faktor« jetzt wieder zum Knochenmark gelangt. Da ein Defizit an diesem, nach den Versuchsergebnissen im Magen gebildeten Stoff Anaemie hervorruft, muss er für die normale Erythropoese notwendig sein.

Bevor die Frage, welcher Art dieser »Faktor« ist, näher erörtert wird, sei zunächst an eine Reihe klinischer und experimenteller Erfahrungen erinnert, die auf funktionelle Beziehungen des Magens sowohl zu hypochromen wie zu hyperchromen Anaemien, bezw. zur Erythropoese hinweisen (vergl. die zusammenfassende Darstellung Singer's). Bei Achylia gastrica kommen hypochrome »Chloranaemien« und hyperchrome perniziöse Anaemien vor, erstere weit häufiger (Einhorn, Faber, Borgbjaerg u. Lottrup). Umgekehrt gibt es aber auch histaminrefraktäre Achylien ohne jede Blutveränderung, und, wenn auch selten, sichere Fälle von Anaemia perniciosa mit erhaltener Pepsin- und Salzsäureproduktion. Die Achylie geht bei der perniziösen Anaemie den Blutveränderungen oft lange Zeit voraus. In Familien, in denen Anaemia perniciosa häufig vorkommt, haben nicht selten andere Familienmitglieder bereits von früher Jugend an eine Achylia gastrica, z. T. ohne Blutveränderungen, z. T. mit hypochromer Anaemie (Minot, Gram, Wilkinson u. Brockbank, Hurst, Heath, Schulten u. a.). Mit Achylie verbundene hypochrome Anaemien können in eine typische hyperchrome Anaemie umschlagen (Biermer, Minot, Gram, Wilkinson u. Brockbank, Schulten, Hurst, Damashek, Heath, Singer u. a.).

Nach grossen Magensresektionen beim Menschen wurden wiederholt langdauernde Anaemien von hypochromem Typus beobachtet (Riedel, Gutzeit). Naegeli betont allerdings, dass es auch zahlreiche Patienten gibt, die nach einer grossen Magenresektion nicht anaemisch wurden. Im Tierexperiment, bei Hunden, fand Gutzeit regelmässig schwere und langdauernde hypochrome Anaemien nach Totalresektion des Magens. Bei zwei Schweinen entstand nach dem gleichen Eingriff zuerst eine hypochrome Anaemie, die nach einigen Monaten in den hyperchrom-makrocytären Typus überging (Bence). Ähnliche Anaemien, aber nie eine echte Perniciosa, entwickeln sich bei Hunden auch nach Resektion allein des Pylorus, des Pylorus und des Duodenums oder des Pylorus und der Brunnerschen Drüsen des Duodenums, wie Petri u. Mitarb. beobachteten. Die Leber der Schweine verliert nach totaler Magenresektion, wie Bence und später Goodman, Geiger u. Claiborn fanden, aber merkwürdigerweise auch nach Resektion allein des Magenfundus (Petri, Bing, E. Nielsen u. A. K. Nielsen) teilweise oder vollkommen ihre antiperniciöse Wirksamkeit, wie auch die Leber von Kranken mit Anaemia perniciosa keinen Perniciosa-Schutzstoff enthält (Ivy, Richter u. Kim).

Beziehungen zwischen Achylie bzw. operativem oder experimentellem Ausfall der Magenfunktion einerseits und der Entwicklung anaemischer Zustände andererseits waren auf Grund aller dieser Erfahrungen unbestreitbar. Die Art dieser Wechselbeziehungen musste aber kompliziert und unklar erscheinen. Eine weitergehende Klärung der stofflichen Natur dieser funktionellen Zusammenhänge gelang nur in zwei Richtungen. Für eine bestimmte kleinere Gruppe von sog. essentieller mikrocytär-hypochromer Anaemie, die meist mit Achylie verbunden ist, konnte der Eisenmangel als aetiologisches Moment durch den einwandfreien therapeutischen Erfolg sichergestellt werden (Schulten). Bei diesen Kranken entwickelt sich der Eisenmangel offenbar infolge einer Störung der Fe-Resorption, die durch die schon vorher bestehende Achylie verursacht wird. Man muss aber fragen, weshalb nicht bei jeder Achylie ein derartiger Eisenmangel auftritt. Für die

weit grössere Gruppe der makrocytär-hyperchromen Anaemien vom Typus der Perniciosa (Biermer, Addison) wurde die Bedeutung des Magens durch die Untersuchungen von Castle u. Mitarb. weitgehend aufgeklärt. Bekanntlich wies Castle nach, dass in der Magenschleimhaut des Menschen und des Schweines ein fermentartiges, thermolabiles wirksames Prinzip (»intrinsic factor«) gebildet und in das Lumen des Magens abgegeben wird. Dieser Stoff vereinigt sich in vivo und in vitro mit bestimmten Nahrungsbestandteilen, vor allem Muskelfleisch (dem »extrinsic factor«), zu einem thermostabilen Reaktionsprodukt. Dieses bewirkt bei Kranken mit unbehandelter perniziöser Anaemie eine »Reticulocytenkrise« (vergl. Seite 400—401) und eine Vermehrung des Erythrocytengehaltes im Blut, und ist nach verschiedenen charakteristischen Eigenschaften mit dem seit Minot u. Murphy bekannten Antiperniciosa-Schutzstoff aus Leberextrakten identisch. Der »intrinsic factor« findet sich nach Castle ausschliesslich in der Magenschleimhaut. Meulengracht lokalisierte als Bildungsort des antianaemischen Prinzipes im Schweinemagen die Pylorusdrüsen und die Brunnerschen Drüsen des Duodenums. Die wenigen diesen Stoff bildenden Drüsen im Fundus und in der Cardiagegend sind »Pylorusdrüsen«. Im Lumen des Duodenums, des Dün- und Dickdarms gefundene kleine Mengen von »intrinsic factor« verschwinden nach Auswaschen (Dexter, Heinle, Fox u. Castle). Der »extrinsic factor« findet sich ausser im Muskelfleisch auch reichlich in der Leber, in anderen inneren Organen und in der Hefe. Er ist offenbar mit Vitamin B<sub>12</sub> identisch (Strauss u. Castle). Das im Lumen des Magens entstehende Reaktionsprodukt der beiden Faktoren soll erst im Duodenum resorbiert werden und in die Blutbahn gelangen.

Im menschlichen Magensaft wird stets »intrinsic factor« gefunden, auch bei Achylien mit oder ohne hypochrome Anaemie. Er fehlt dagegen im Magensaft der Kranken mit perniziöser Anaemie, auch wenn diese ausnahmsweise nicht achylisch waren. Diese Feststellung Castle's u. seiner Mitarb. wurde von den verschiedensten Seiten bestätigt. Abweichend be-

richten nur Barnett über 2 Patienten, Wolf u. Reimann sowie Schlesinger über je 1 Fall von Anaemia perniciosa, deren Magensaft reichliche Mengen von intrinsic factor enthielt. Es ist möglich, dass bei einem dieser Patienten eine Resorptionsstörung im Darm bestand. Seit den Beobachtungen Castle's u. Mitarb. wird als sicher angesehen, dass die Anaemia perniciosa und manche Makrocyten-Anaemien in den Tropen durch einen Mangel an »intrinsic factor« entstehen. Einige »symptomatische« hyperchrome Tropen-Anaemien, z. B. bei Sprue und Pellagra, werden dagegen durch den Mangel an »extrinsic factor« bzw. Vitamin B<sub>2</sub> verursacht. Die Befunde von Castle machten auch die therapeutischen Effekte von Magenpräparaten bei perniziöser Anaemie verständlich. Allerdings besteht hier insofern eine Schwierigkeit, als die klinische Erfahrung zeigt, dass manche dieser Kranken zweifellos besser auf Magenpräparate, andere aber weit besser oder sogar allein auf Leberpräparate reagieren. Dies Verhalten lässt doch gewisse Zweifel aufkommen, ob die Genese der perniziösen Anaemie so ausschliesslich und einfach darin besteht, dass infolge des Mangels an intrinsic factor des Magens die Bildung des antianaemisch wirksamen Reaktionsproduktes mit dem extrinsic factor unmöglich wird, oder ob nicht doch der Antiperniciosa-Schutzstoff, wie er in der Leber gefunden wird, eine besondere Bedeutung hat. Wie dem auch sei, grundsätzlich kann das Castle'sche Ferment als antianaemisches Prinzip bisher nur zu der Entstehung der hyperchrom-makrocytären Anaemien und zu der Bildung des Antiperniciosa-Schutzstoffes der Leber in Beziehung gebracht werden, dagegen nicht zu der normalen Erythropoese. Auch die Pathogenese zahlreicher anderer hypochromer »gastrischer« bzw. »agastrischer« Anaemien blieb weiter unklar.

Es ist jetzt zu erörtern, was sich aus den experimentellen Befunden dieser Arbeit zu den eben skizzierten Beobachtungen und Problemen ergibt. Die nach Unterbrechung des venösen Blutstromes zwischen Magen und Leber entstehenden Anaemien können nicht auf einem Eisenmangel beruhen. Eine durch Fe-Mangel hervorgerufene Anaemie könnte sich bei den

reichlichen Beständen des Organismus an diesem Stoff niemals bereits innerhalb von 2 bis 4 Tagen entwickeln. Ausserdem stehen dem mit der Nahrung aufgenommenen Eisen in diesen Versuchen genügend Wege offen, um über die Ösophagusvenen oder über das in seiner Zirkulation nicht behinderte Duodenum in den Kreislauf zu gelangen. Schliesslich löst Eisen nicht so starke Reticulocytenkrisen aus, wie sie in diesen Versuchen beobachtet wurden. Auch ein Defizit an anderen Nahrungsbestandteilen, z. B. an extrinsic factor, kommt für diese Anaemien als Ursache nicht in Frage. Alle Versuchstiere wurden vom 2. bis 3. postoperativen Tag an in gleicher Weise ernährt, wie vor dem Eingriff. Irgendwelche Störungen von Seiten des Darmtrakts, die eine Schädigung der Resorption wichtiger Nahrungsbestandteile bewirken könnten, wurden niemals erkennbar.

Es scheint zunächst naheliegend, zu fragen, ob nicht der in diesen Versuchen an der Passage zur Leber gehinderte »Magenfaktor« mit dem Castle'schen Ferment, dem intrinsic factor, identisch ist. Hier wird man zuerst einwenden, dass Castle's Ferment durch seinen Mangel stets eine hyperchrom-makrocytäre Anaemie hervorruft, während die experimentell erzeugten Anaemien nicht diesen Typus zeigten. Wie aber erwähnt, kan nach Erfahrungen aus der menschlichen Pathologie eine anfangs hypochrom-mikrocytäre Anaemie, die mit Achylie verbunden ist, nach Jahren in den hyperchrom-makrocytären Typus übergehen. Auch nach totaler Magenresektion erkrankt ein relativ hoher Prozentsatz von Patienten erst nach Monaten bis Jahren an echter perniziöser Anaemie. Schliesslich wurden bereits die von Bence Magenresezierten Schweine erwähnt, die zuerst einige Monate eine hypochrome Anaemie hatten, die dann später hyperchrom-makrocytär wurde. Nach all dem scheinen die Beziehungen zwischen der hypochromen und der hyperchromen Form der Anaemie enger, als man früher im allgemeinen annahm. In den Experimenten dieser Arbeit bestanden die Anaemien nicht so lange Zeit, wie es etwa für einen denkbaren Übergang in den hyperchromen Typus notwendig gewesen wäre. Die eindeutige Beziehung des



Castle'schen Fermentes allein zu der hyperchromen perniciosen Anaemie lässt also nicht a priori seine Identität mit dem »Magenfaktor« dieser Tierversuche ausschliessen.

Wesentlicher sind aber andere Einwände: Im Magensaft des Hundes lässt sich nach den meisten bisherigen Befunden (Ivy, Richter u. Kim, Singer) kein intrinsic factor nachweisen, der bei der Verdauung von Muskelfleisch einen wirksamen Antiperniciosa-Schutzstoff bilden könnte. Für den Magensaft des Kaninchens liegen diesbezüglich keine Erfahrungen in der Literatur vor. Man muss aber bedenken, dass selbst bei vorhandenem Castle'schem Ferment im Magen der operierten Tiere dieses dort mit den exogenen Faktoren in normaler Weise in Verbindung treten könnte und die Resorption des antianaemischen Reaktionsproduktes im Duodenum und Dünndarm ungestört erfolgen könnte. Wäre also der »Magenfaktor« dieser Versuche mit dem »intrinsic factor« Castle's identisch, so müsste man annehmen, dass entweder das aus intrinsic und extrinsic factor gebildete antianaemische Reaktionsprodukt entgegen der bisherigen Meinung nicht im Duodenum sondern im Magen in die Blutbahn aufgenommen wird, oder dass durch die experimentelle Zirkulationsstörung am Magen vorübergehend die Bildung des intrinsic factor unmöglich gemacht wird. Gegen letztere Annahme spricht aber, dass gerade der wesentliche Bildungsort des »intrinsic factor«, die Pylorusdrüsen und die Brunnerschen Drüsen des Duodenums (Meulengracht), von der experimentell erzeugten Zirkulationsstörung nicht betroffen sind (vergl. Seite 379 und 386). Die Stauung erstreckt sich vielmehr auf Fundus und Cardia. In beiden eben diskutierten Fällen erscheint es auch kaum plausibel, dass sich schon in wenigen Tagen eine Anaemie entwickeln sollte. Bekanntlich enthält die Leber einen reichlichen Vorrat an Antiperniciosa-Schutzstoff, der nicht so rasch aufgebraucht sein kann.

Hierzu kommt, dass verschiedene Befunde für eine direkte Reizwirkung des »intrinsic factor« auf das Knochenmark sprechen. Die Injektion kleiner Mengen von normalem menschlichen Magensaft bewirkt bei Ratten eine »Reticulocytenkrise«

(Gänsslen, Singer u. a.), während Magenextrakte von Patienten mit perniziöser Anaemie diesen Effekt vermissen lassen. In den Tierexperimenten dieser Arbeit stand dem Blut der direkte Weg zum Knochenmark über die Ösophagusvenen und die V. cava gerade zu der Zeit offen, während der die Zirkulationsunterbrechung zwischen Magen und Leber die Anaemien bewirkte. *Der aus diesen Versuchen sich ergebende »Magenfaktor« wirkt allein demnach weder knochenmarksreizend noch erythropoetisch. Diese letzteren Effekte entstehen nur, wenn der »Magenfaktor« auf dem normalen Blutweg die Leber erreicht, es bedarf zu ihrer Auslösung also noch eines »Leberfaktors«.* Wäre der »Magenfaktor« mit dem Castle'schen Ferment identisch, so könnte letzteres auf dem Weg über die V. cava nicht nur das Knochenmark erreichen, sondern es wäre auch die für die Entstehung des antianaemischen Stoffes notwendige Vereinigung mit dem extrinsic factor leicht möglich, der in der Muskulatur und andernorts reichlich vorhanden ist. So wäre also kaum zu verstehen, weshalb es überhaupt zu einer Anaemie kommen sollte, und ebensowenig, weshalb ihr Rückgang mit einer Reticulocytenkrise einsetzt.

Die gleiche Überlegung gilt auch für einen anderen möglicherweise im Magen vorhandenen knochenmarksreizenden Stoff, das »Addisin« von Morris, Schiff, Foulger, Rich, Sherman u. Felson. Diese Autoren zeigten, dass im Vacuum auf wenige cem eingeeingter Magensaft, bei Kranken mit perniziöser Anaemie parenteral injiziert, eine Reticulocytenkrise und einen Anstieg der Haemoglobin- und Erythrocytenwerte hervorruft. Da normaler neutralisierter Magensaft bzw. der in ihm enthaltene intrinsic factor, allein peroral verabreicht, bei Patienten mit Anaemia perniciosa bekanntlich unwirksam ist — er entwickelt seinen antianaemischen Effekt nur bei gleichzeitiger Zufuhr von extrinsic factor — so meinten die genannten Autoren, dass sie es bei ihren eingeeingten Extrakten mit einem besonderen Stoff zu tun hätten, der nicht mit dem intrinsic factor identisch wäre. Ganz zwingend ist dieser Schluss nicht, da der parenteral injizierte Magensaft im Organismus

des Kranken genügend extrinsic factor vorfindet, mit dem er den Antiperniciosa-Schutzstoff bilden könnte. Mag es sich aber bei dem »Addisin« um einen besonderen antianaemischen Stoff handeln oder nicht, seine Reizwirkung auf das Knochenmark, das es über die Ösophagusvenen auch bei Zirkulationsunterbrechung zwischen Magen und Leber ungehindert erreichen würde, lässt ebenfalls seine Identität mit dem »Magenfaktor« der Tierversuche ausschliessen.

Die Gegenüberstellung der Eigenschaften der beiden bisher bekannten antianaemischen Stoffe des Magens, des »intrinsic factor« und des »Addisin«, mit den experimentellen Befunden dieser Arbeit führt also zu dem Schluss, dass der »Magenfaktor« mit keinem der beiden genannten Körper identisch sein kann. Stehen »intrinsic factor« und »Addisin« allein in einer sicheren Beziehung zur Anaemia perniciosa, so hat der antianaemische »Magenfaktor«, dessen Existenz sich aus den am Kaninchen und Hund durchgeführten Versuchen ergab, ein eindeutiges Verhältnis zu der normalen Erythropoese. Die Versuchsergebnisse lassen allein folgende Deutung zu: *Von seinem Bildungsort, dem Fundus des Magens, gelangt der »Magenfaktor« auf dem Blutwege über die V. coronaria ventriculi und die Vv. gastro-epiploicae in die V. portae und zur Leber. Durch seine Einwirkung auf oder die Vereinigung mit einem »Leberfaktor« entstehen die auf das Knochenmark wirksamen Substanzen. Das Reaktionsprodukt der beiden Faktoren ist für die normale Erythropoese notwendig.* Weder der »Magenfaktor« noch der »Leberfaktor« allein genügen, um die Blutbildung auf ausreichender Höhe zu halten. Dies geht aus den Versuchen hervor, in denen durch die Zirkulationsunterbrechung in der V. coronaria ventriculi, in der V. lienalis oder den gastro-lienalen Venen die Vereinigung der beiden Faktoren unmöglich gemacht bzw. quantitativ eingeschränkt wurde. Die Reaktion der beiden Faktoren muss quantitativ sein, da die totale Unterbrechung des Blutstromes zwischen Magen und Leber eine stärkere Anaemie bewirkt als eine nur partielle Blockade. Sobald der »Magenfaktor« wieder in die

Leber und damit zu dem »Leberfaktor« gelangen kann, entstehen von neuem die auf das Knochenmark wirkenden erythropoetischen Stoffe. Diese rufen zunächst, ebenso wie der Antiperniciosa-Schutzstoff der Leber, eine Reticulocytenkrise hervor, an die sich dann im Laufe der folgenden Tage und Wochen ein Anstieg der Haemoglobin- und Erythrocytenwerte im Blut anschliesst.

Da der »Leberfaktor« ohne den »Magenfaktor« die normale Erythropoese nicht aufrechtszuerhalten vermag, kann er nicht mit dem Antiperniciosa-Schutzstoff der Leber identisch sein. Denn letzterer wirkt bekanntlich auch allein knochenmarksreizend und antianaemisch. Das Reaktionsprodukt aus »Magenfaktor« und »Leberfaktor« kann übrigens nicht als allgemein knochenmarksreizend bezeichnet werden. Die Leukopoese wird nicht beeinflusst, die Anaemien der Tierversuche gingen mit keiner Leukopenie einher. Vielmehr wirkt dieses Reaktionsprodukt der beiden Faktoren ausschliesslich auf die Bildung der Erythrocyten, es ist also sensu strictiori erythropoetisch.

Man könnte sich gut vorstellen, dass ein Ausfall dieses »Magenfaktors«, sei es ein Defekt in der Bildung, sei es eine funktionelle Wegstörung, wodurch die Entstehung des erythropoetisch wirksamen Reaktionsproduktes mit dem »Leberfaktor« eingeschränkt oder unmöglich gemacht wird, die pathogenetische Ursache mancher »gastrischer« oder »agastrischer« Anaemien darstellt. In diesem Zusammenhang ist ein von Singer veröffentlichter Fall von hochgradiger Polyglobulie von Interesse, der nach einer Magenresektion wegen eines gleichzeitig bestehenden Ulcus ventriculi heilte. Aus Beobachtungen von Sven Ingvar geht auch hervor, dass nicht selten Patienten mit Polycythaemia vera bei dem Auftreten von Milzvenenthrombosen einen auffallenden Rückgang der Erythrocytenzahlen und eine klinische Besserung erkennen lassen. Schliesslich könnte die therapeutische Wirkung der Magenpräparate, die bisher nur mit ihrem Gehalt an intrinsic factor erklärt werden konnte, noch in anderer Beziehung bedeutungsvoll erscheinen. Diese klinischen und therapeutischen Aus-

blicke, die sich durch die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit eröffnen, haben selbstverständlich eine Voraussetzung: durch weitere Befunde ist die Existenz und funktionelle Bedeutung dieses bei Kaninchen und Hunden festgestellten »Magen- und Leberfaktors« und ihres erythropoetischen Reaktionsproduktes auch für andere Tierspezies und für den Menschen zu beweisen. Es könnte voreilig sein, die tierexperimentell gewonnenen Ergebnisse ohne weiteres auf die Verhältnisse beim Menschen zu übertragen. Es wäre nicht unmöglich, dass bei den verschiedenen Tierspezies die antianaemischen Stoffe des Magens und der Leber unterschiedlich sind. Es ist natürlich auch eine Aufgabe späterer Untersuchungen, der stofflichen Natur dieses Magen- und Leberfaktors sowie ihres Reaktionsproduktes über die Feststellung ihrer Wirkungen hinaus im einzelnen nachzugehen.

Aber soviel lässt sich eindeutig konstatieren: Diese experimentellen Untersuchungen gingen von dem Problem aus, wodurch die Anaemien bei Thrombosen im Pfortadergebiet, insbesondere bei der Milzvenenthrombose, entstehen. Diese Frage kann jetzt dahin beantwortet werden, dass *der allein für die Entwicklung der Anaemien entscheidende Faktor durch die Unterbrechung des venösen Blutstromes zwischen Magen und Leber gegeben ist*. Nur solche Thrombosen im Pfortadergebiet wirken *anaemisierend*, bei denen die *Zirkulation zwischen Magen und Pfortader partiell oder total blockiert* wird. Die isolierte Milzvenenthrombose bewirkt ebenfalls auf diese Weise eine Anaemie, da ein Teil des venösen Blutes vom Magen über die Vv. gastro-epiploicae und die V. lienalis in die V. portae fließt. Die Anaemie wird um so hochgradiger, je kompletter diese venöse Blockade des Magens ist. Die Existenz oder Funktion der Milz ist für die Entstehung dieser Anaemien bedeutungslos.

Die Einwirkung der Zirkulationsunterbrechung zwischen Magen und Leber auf den haematopoetischen Apparat der Versuchstiere entsteht nicht durch die unmittelbar resultierende Stauung, oder etwa durch Blutungen in den Magen oder Darmkanal. Vielmehr lassen sich die Versuchsergebnisse nur

so deuten, dass ein für die normale Erythropoese notwendiger Stoff durch die Eingriffe an der Passage vom Magen in die Leber gehindert wird. Dieser »Magenfaktor« allein ist ohne Wirkung auf das Knochenmark, da er auch bei kompletter Sperrung des Blutstromes zur Pfortader über die Ösophagusvenen und die V. cava ungehindert das Knochenmark erreichen kann. Seine erythropoetischen Effekte entstehen nur dann, wenn er in die Leber gelangt, sie sind also an die Reaktion mit einem »Leberfaktor« geknüpft. Dieser Leberfaktor für sich allein ist ebenso unwirksam, da auch er im anaemischen Stadium ungehindert das Knochenmark erreichen kann. *Erst das Reaktionsprodukt der beiden Faktoren wirkt erythropoetisch.* Ein Mangel an diesem Reaktionsprodukt ist die Ursache dieser experimentellen Anaemien. Wird durch die Revascularisierung der thrombosierten Venen die Vereinigung des »Magensfaktors« und des »Leberfaktors« und damit die Entstehung des Reaktionsproduktes beider wieder möglich, so gehen die Anaemien bis zur Norm zurück. Dieser Heilungsprozess beginnt mit der Ausschwemmung jugendlicher reticulierter Erythrocyten in die Blutbahn, mit einer Reticulocytenkrise. Der »Magenfaktor« dieser Versuche am Kaninchen und Hund kann nicht mit einem der bisher bekannten anti-anaemischen Stoffe des Magens, dem intrinsic factor und dem Addisin, identifiziert werden, da sich seine Wirkungsweise von letzteren eindeutig unterscheidet. Ebensowenig ist der »Leberfaktor« mit dem Antiperniciosa-Schutzstoff der Leber identisch.

Mit der Erkenntnis, dass es allein die Ablenkung eines für die normale Erythropoese notwendigen Stoffes, des »Magenfaktors« dieser Versuche, von seinem Blutweg in die V. portae und die Leber ist, die die Ursache für die Anaemien bei Thrombosen im Pfortadergebiet darstellt, führten diese Untersuchungen über den Rahmen der ursprünglichen Zielsetzung hinaus zu dem weit allgemeineren Problem der stofflichen Bedingungen, unter denen bei physiologischen und pathologischen Verhältnissen die Erythropoese erfolgt.

### *Zusammenfassung:*

1) Die Entstehungsbedingungen der Anaemien bei Thrombosen im Pfortadergebiet, insbesondere bei der Milzvenenthrombose, wurden an Kaninchen und Hunden experimentell untersucht.

2) Die experimentelle Thrombosierung durch Unterbindung der V. mesenterica superior ruft niemals eine Anaemie hervor. Die isolierte Unterbrechung der V. lienalis macht nur etwa die Hälfte der Versuchstiere vorübergehend anaemisch. Regelmässig wird eine mehrere Wochen anhaltende Anaemie ausgelöst, wenn die V. coronaria ventriculi, die Vv. gastro-epiploicae oder die V. coronaria ventriculi gleichzeitig mit den Vv. gastro-epiploicae unterbunden bezw. durchschnitten werden.

3) Diese Unterbindungen wurden teils in einer Operation, teils in wiederholten Eingriffen am gleichen Versuchstier ausgeführt. Nach gleichzeitiger Unterbindung der V. lienalis und der gastro-lienalen Venen wird die Milz der Kaninchen atrophisch.

4) Langdauernde Anaemien entstehen auch nach Unterbindung der V. coronaria ventriculi gleichzeitig mit Exstirpation der Milz, bezw. bei Unterbindung dieses Gefässes gleichzeitig mit dem funktionellen Ausfall der atrophischen Milz.

5) Die Abnahme der Haemoglobin- und Erythrocytenwerte im Blut beginnt in allen Versuchen 2 bis 4 Tage nach den Operationen, und erreicht in der Regel in der 2. bis 3. postoperativen Woche ihr Maximum. Zu dieser Zeit kommt es zu einer krisenartigen Vermehrung der Reticulocyten im strömenden Blut, bisweilen bis auf 100 bis 200 pro Mille. An diese Reticulocytenkrise schliesst sich regelmässig ein Wiederanstieg der Haemoglobin- und Erythrocytenwerte an, die 3 bis 6 Wochen nach den operativen Eingriffen wieder ihr Ausgangsniveau erreichen.

6) Die Versuche zeigen, dass allein die partielle oder totale Unterbrechung des venösen Blutstromes zwischen Magen und Pfortader bezw. Leber für die Entstehung der Anaemien

entscheidend ist. Die isolierte Thrombosierung der V. lienalis wirkt ebenfalls dadurch anaemisierend, dass der Anteil des venösen Magenblutes am Abstrom in die V. portae gehindert wird, der seinen Weg über die gastro-lienalen Venen nimmt. Die Anaemien sind um so hochgradiger, je kompletter die Stromunterbrechung zwischen Magen und Leber ist. Die Existenz oder der Ausfall der Milzfunktionen beeinflusst weder die Entstehung noch den Grad der Anaemien in diesen Versuchen. Die Reticulocytenkrise und der Rückgang der Anaemien fällt zeitlich mit der Wiedereröffnung von Gefäßbahnen zwischen Magen und Leber zusammen, sei es durch Ausbildung von Kollateralen, sei es durch Revascularisierung vorher thrombosierter Venen.

7) Diese Versuchsergebnisse können nur so gedeutet werden, dass durch die partielle oder totale venöse Blockade ein dem Magen entstammender antianaemischer Faktor nicht in ausreichenden Mengen bzw. überhaupt nicht in die Leber gelangt.

8) Dieser »Magenfaktor«, der sich bei Kaninchen und Hunden für die Aufrechterhaltung der normalen Erythropoese als notwendig erweist, übt für sich allein keine Wirkung auf das Knochenmark aus. Sein erythropoetischer Effekt entsteht nur, wenn er die Leber erreicht, also durch die Einwirkung auf bzw. die Vereinigung mit einem »Leberfaktor«. Letzterer allein für sich ist ebenfalls ohne Wirkung auf das Knochenmark. Erst das Reaktionsprodukt der beiden Faktoren wirkt erythropoetisch. Es löst bei seiner erneuten Entstehung nach den Stromunterbrechungen eine Reticulocytenkrise aus, deren Grad dem Ausmaass der Anaemie proportional ist.

9) Nach Eigenschaften und Wirkungen ist der »Magenfaktor« dieser Versuche mit keinem der bisher bekannten anti-anaemischen Stoffe des Magens (dem Castle'schen intrinsic factor und dem Addisin) identisch, ebensowenig der »Leberfaktor« mit dem Antiperniciosa-Schutzstoff der Leber. Die möglichen Beziehungen des sich aus diesen Tierversuchen ergebenden »Magenfaktors« und »Leberfaktors«, sowie ihres



für die normale Erythropoese notwendigen Reaktionsproduktes zu einigen Problemen der klinischen Pathologie werden diskutiert.

### LITERATURVERZEICHNIS.

- Addison*: London med. Gaz. 1849. Idiopathic anemia, on the constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsules. London. 1855.
- Asher u. Sollberger*: Biochem. Z. 55. 13. 1913.
- Asher u. Vogel*: Biochem. Z. 43. 386. 1912.
- Barnett*: Amer. J. med. Sci. 182. 170. 1931.
- Bence*: Z. klin. Med. 126. 127. 1933. Z. klin. Med. 130. 275. 1936.
- Biermer*: Eine eigentümliche Form von progressiver perniziöser Anaemie. 42. Vers. dt. Naturf. u. Aerzte. Dresden. 1868. Korrespondenzbl. f. Schweizer Aerzte. 1872. 15.
- Bock u. Frenzel*: Klin. Wschr. 1938. Nr. 38. 1315.
- Borgbjaerg u. Lottrup*: Acta med. Scand. 72. 539. 1929.
- Cesaris-Demel*: Fol. haematolog. 4. Suppl. 3, 1. 1907.
- Castle*: Amer. J. med. Sci. 178. 748. 1929.
- Castle u. Locke*: J. clin. invest. 6. 2. 1928/29. (Proc.).
- Castle u. Rhoads*: Lancet. 1932, I. 1198.
- Castle u. Townsend*: Amer. J. med. Sci. 178. 764. 1929.
- Castle, Heath u. Strauss*: Amer. J. med. Sci. 182. 741. 1931.
- Castle, Townsend u. Heath*: Amer. J. med. Sci. 180. 305. 1930.
- Damashek*: Amer. J. med. Sci. 182. 520. 1931. J. amer. med. Assoc. 100. 540. 1933.
- Dexter, Heinle, Fox u. Castle*: J. clin. Invest. 18. 473. 1939. (Proc.).
- Einhorn*: N. Y. med. Rec. 63. 321. 1903. zit. nach Schulten (s. u.).
- Eppinger*: Berl. klin. Wschr. 1913. 1509. 1572. 2409. Die hepato-lienalen Erkrankungen. Monogr. Springer. Berlin. 1920.
- Faber*: Med. Klinik. 1909. 1310. Berl. klin. Wschr. 1913. 598.
- Faber u. Gram*: Arch. int. Med. 34. 658 u. 827. 1934.
- Gänsslen*: Med. Welt. 1932. Nr. 46.
- Gebhardt u. Fricke*: Z. ges. exp. Med. 77. 743. 1931.
- Goodman, Geiger u. Claiborn*: J. clin. Invest. 15. 474. 1936 u. 16. 666. 1937.
- Gram*: Acta med. Scand. 34. 107. 1930. Fol. haematolog. 39. 461. 1930.
- Gutzeit*: Verh. dt. Ges. inn. Med. Wiesbaden. 1932. 478. Klin. Wschr. 1932. Nr. 11. 376.
- Heath*: Amer. J. med. Sci. 185. 365. 1933.
- Hesse*: Acta med. Scand. 47. 207. 1938.
- Hesse u. Trier*: Ugeskrift for Læger. 36. 935. 1937.

- Hirschfeld, H.*: Die Erkrankungen der Milz. Monogr. Springer. Berlin. 1920. Die Splenomegalien, in Kraus-Brugsch. Spez. Path. u. Ther. inn. Krankh. Bd. 8. 149. 1920.
- Hurst*: Quart. J. Med. 1. 157. 1932.
- Ingvar, Sven*: Mündl. Mittlg.
- Ivy, Richter u. Kim*: Amer. J. Physiol. 101. 59. 1932.
- Krumbhaar*: Physiolog. Rev. 6. 160. 1926.
- Lubarsch*: Patholog. Anatomie der Milz, in Handb. d. spez. path. Anat. Histol. (Lubarsch-Henke). Bd. I, 2. 374. 1927.
- Meulengracht*: Acta med. Scand. 82. 352 u. 384. 1934 und 85. 50 u. 79. 1935. Med. Welt. 1938. 12. 132.
- Minot*: J. amer. med. Assoc. 99. 1906. 1932.
- Minot u. Castle*: Lancet. 1935, II. 320.
- Minot u. Murphy*: J. amer. med. Assoc. 87. 470. 1926 und 89. 759. 1927.
- Minot, Cohn, Murphy u. Lawson*: Amer. J. med. Sci. 175. 599. 1928.
- Minot, Murphy u. Stetson*: Amer. J. med. Sci. 175. 581. 1928.
- Morawitz*: Arch. Verdauungskrankh. 47. 305. 1930.
- Morris, Schiff, Burger u. Sherman*: Amer. J. med. Sci. 184. 778. 1932.
- Morris, Schiff, Foulger, Rich u. Sherman*: Brit. med. J. 1932. 1050. J. amer. med. Assoc. 100. 171. 1933.
- Morris, Schiff, Rich, Foulger u. Felson*: Ann. int. Med. 6. 1535. 1933.
- Naegeli, O.*: Blutkrankheiten u. Blutdiagnostik. Springer. Berlin. 1921. Diskussion zu Seyderhelm. Verh. dt. Ges. inn. Med. Wiesbaden. 1933. 89.
- Paton, Gulland u. Fowler*: J. Physiol. 28. 83. 1902.
- Pearce u. Pepper*: J. exper. Med. 20. 19. 1914.
- Petri, Nørgaard u. Jensenius*: Acta med. Scand. 107. 506. 1941.
- Petri, Jensenius u. Thyssen*: Acta med. Scand. 107. 532. 1941.
- Petri, Bing, E. Nielsen u. A. K. Nielsen*: Acta med. Scand. 109. 59. 1941.
- Ponticaccia*: Giorn. Clin. med. 1925. H. 1/2.
- Rieder*: Chirurg. 2. 565. 1930.
- Schlesinger, A.*: Klin. Wschr. 1933. Nr. 8. 298.
- Schulten, H.*: Münch. med. Wschr. 1932. 665. Erg. inn. Med. Kinderheilk. 46. 236. 1934.
- Singer, K.*: Erg. inn. Med. Kinderheilk. 47. 421. 1934.
- Strauss u. Castle*: New England J. of Med. 207. 55. 1932. Lancet. 1932, I. 1198.
- Sturgis u. Isaacs*: J. amer. med. Assoc. 93. 747. 1929. Amer. J. med. Sci. 180. 597. 1930.
- Wilkinson*: Quart. J. Med. 25. 361. 1932.
- Wilkinson u. Brockbank*: Quart. J. Med. 24. 219. 1931.
- Wolf u. Reimann*: Z. klin. Med. 130. 789. 1936.

DANSK PATOLOGFORENINGS 4. MØDE 10/4 1942  
I KØBENHAVN.

*The fourth meeting of the danish pathological society,  
april 10, 1941.*

*Quatrième séance des pathologistes danois le 10 avril 1942.*

*Vierte dänische Pathologentagung am 10. April 1942.*

Erik Andreassen: *Sexual Function and Resistance.*

In connection with a fairly comprehensive study of the thymolymphatic system in normal albino rats some skin lesions were observed, which under the existing conditions attack only animals living in sexual abstinence. The affection was cured when the animals were given the chance of a normal sexual life.

These facts were interpreted as follows: The skin lesions are taken to be infected scratches. In unpaired animals the scratches may become the site of infectious processes because sexual abstinence lowers the resistance of the organism. A curative effect asserts itself during cohabitation with the other sex because the performance of the normal sexual functions gradually increases the natural resistance of the animal.

This interpretation is supported by a number of papers published by Agduhr. Agduhr's investigations have shown that the absence of a normal sexual life in the small rodents is of considerable biological consequence, producing parenchymatous changes in the endocrine organs and being associated with a lowered resistance to many noxious factors.

(Further particulars are given in *Acta physiol. scand.* 1942).

No discussion.

Ed. Sørensen: *The Dehydrogenization Power of Sperm Cells, a Measure of the Fertility of Sperm.*

The criteria employed hitherto for estimation of the fertility of sperm are the concentration of the sperm and the motility of the

sperm cells. Further, the amount of immature and deformed sperm cells in the semen has been taken as indicative of the fertility.

In recent years, however, the metabolism of the sperm cells is being employed as a measure for the fertility. Walton, of Cambridge, thus found a close concordance between the fertility of the sperm and the magnitude of the anaerobic metabolism of the sperm.

From a number of investigations reported in the last decade, it seems evident that the sperm cells chiefly derive the energy required for their motility by the anaerobic metabolism, and hence it will be proper, too, to make use of the intensity of the anaerobic metabolism as a measure for the fertility of the sperm.

As is well known, the anaerobic metabolism consists in a series of dismutations, that is, a reaction product is oxidized by the liberation of hydrogen, while another reaction product at the same time is produced by combining with the liberated hydrogen. In the cleavage of glucose thus a number of redox systems are formed, in which some reaction products give off hydrogen (hydrogen donors), while others at the same time take up the liberated hydrogen (hydrogen acceptors). The liberation of hydrogen is catalyzed by intracellular enzymes, dehydrogenases.

For determination of the intensity of the anaerobic metabolism the so-called acceptor method is employed, *i. e.*, addition of a suitable acceptor substance which is reduced by the liberated hydrogen mobilized by the hydrogenases. Most often a dye is used for acceptor substance — a dye that is of a strong color when it is oxidized, but of a very faint color or quite colorless when it is reduced. Methylene blue is used most commonly for this purpose, as in relation to many biological processes it has a high redox potential as thus is a suitable acceptor substance.

The addition of a methylene blue solution to sperm results in various redox systems; the various reaction products of glucose and, on the other hand, methylene blue-leucomethylene blue. These systems will now react so that the cleavage products of glucose are oxidized through liberation of hydrogen, these products acting as hydrogen donors, while the methylene blue combines with the liberated hydrogen and is reduced to leucomethylene blue. Thus methylene blue acts as hydrogen acceptor.

The decoloration time for methylene blue then affords an excellent indicator for the liberation of hydrogen, also called the dehydrogenizing activity. A brief decoloration time corresponds to a great dehydrogenizing activity; conversely, a long decoloration time corresponds to a slight dehydrogenizing activity.

As the studies carried out by the author have shown that the dehydrogenases are connected only with living sperm cells, it means that when the decoloration time is brief the sperm under analysis

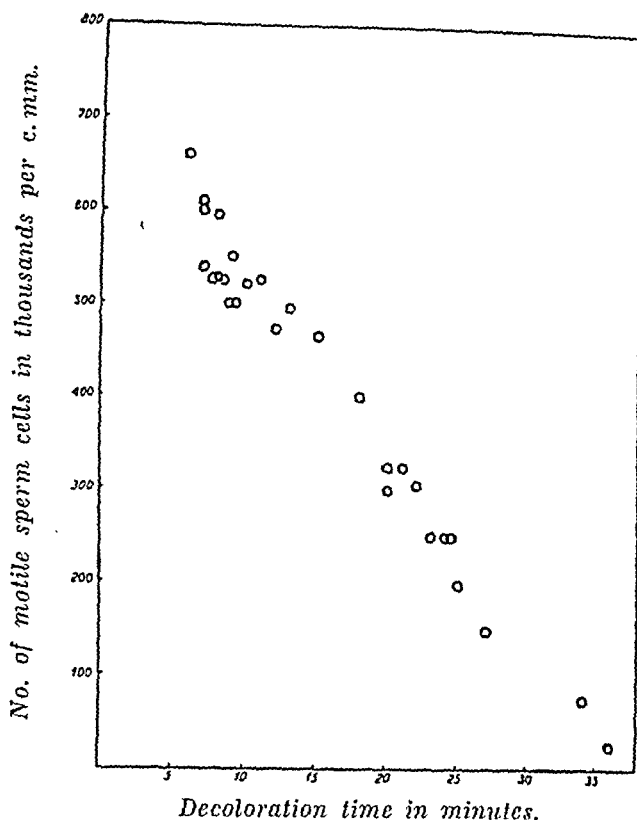


Fig. 1.

Graphical presentation of the decoloration time of various specimens of bull sperm.

contains many living sperm cells, and hence is fertile; when the decoloration proceeds slowly, the sperm contains only a few living sperm cells or many dead ones, and in either instance it is infertile.

The technique for the determination of the dehydrogenizing activity has been worked out by T. Thunberg. The author has followed this technique in principle but modified it so that any practising veterinary surgeon easily can carry out the test. As to the technique, the reader is referred to the original paper, where it is described in detail.

As the decoloration time is inversely proportional to the amount of sperm or, more correctly, its content of living sperm cells, the elaboration of a curve for this relation has made it necessary to determine the amount of living sperm cells in the sperm. For this, the author has adopted the following procedure: The sperm is diluted

1:100, and, after thorough mixing, the number of non-motile sperm cells is determined in the counting chamber. Then the counting chamber is incubated at 60°, and after the sperm cells have been killed, their total number is determined. The difference between the total count and the number of non-motile sperm cells gives the number of living sperm cells.

From the graph, it is evident that the decoloration time closely depends on the amount of living sperm cells in the semen. A curve drawn through the points plotted in the graph will form an almost straight line. The minor deviations are explained by the fact that the counts of sperm cells are encumbered with an error of  $\pm 10\%$ .

The original paper is published in 'Skand. Vet. Tidsskr. 32: p. 358—373, 1942.

No discussion.

Aage Nyfeldt: *The listerella-group*. No report received.

Discussion:

Martin Christensen, P. Krag, V. Friedenreich and Aage Nyfeldt.

Alice Reyn: *Hyperimmunization of Gono-Reaction-Positive Rabbits*.\*)

*Summary.* The experiments reported here were carried out on the basis of studies published by O. Bang and P. Krag on the gono-reaction in medical patients. Among other things, these authors found a pronounced correlation between chronic bronchitis and positive gono-reaction. One of the explanations of this fact was that it involved an »anamnestic seroreaction» as chronic bronchitis maintained or activated the positive gono-reaction — possibly on account of antigenic properties common to *Micrococcus catarrhalis* and *Gonococcus*.

Recently P. Krag tested 10 M.cat. strains in complement fixation tests analogous to the gono-reaction; the strains differed widely in their reaction. One strain, »M. cat. 465«, showed a particularly high reaction percentage with sera received by the Serodiagnostics Department for examination of the Wassermann reaction and gono-reaction. M. cat. 465 was tested against human sera, some of which gave a positive gono-reaction while others were negative in this respect. The reaction percentage was somewhat higher in the group of sera that gave a positive gono-reaction, but the difference was

---

\*) To be published in extenso in a subsequent issue of Acta path. et microbiol. Scandinav.

not significant. There was no definite correlation between the titer heights for the gono-reaction and the catarrhalis reaction (cata-reaction).

At this point of time I had 9 rabbits that had been immunized with gonococci and I decided to carry out some experiments with immunization of these rabbits when they had gone long enough to give a negative gono-reaction. I wanted to see whether immunization with M. cat. might possibly be able to produce a positive gono-reaction. But, as the gono-reaction of these rabbits did not turn negative in the next six months, the experiments were not carried out on rabbits with negative gono-reaction, but on rabbits with a constant positive gono-reaction. The following bacteria were used for the immunization: 1 gonococcus strain, 1 M. cat. strain (465), 1 hemolytic streptococcus, Group A — namely, Str. »Aronson Schnitzer« and 1 paratyphoid B strain. Besides the 9 rabbits which previously were immunized with gonococci, 9 control rabbits were immunized. Further, absorption tests were made.

With these experiments I think it have been able to demonstrate an antigenic relationship between M. cat. 465 and gonococcus on the basis of the following results:

1) When rabbits that previously have been immunized with gonococci are subsequently immunized with M. cat. 465, there is an increase in the titer of the serum, not only in the cat-reaction but also in the gono-reaction (see Table 2).

2) Conversely, there is a rise in the serum titer in the cat-reaction in 2 rabbits hyperimmunized with the gonococci (see Table 1).

3) The gono-reaction keeps constant under immunization of »gonococcal« rabbits with hemolytic streptococci and with paratyphoid B, although a very marked rise is obtained in the titer for the antigens concerned (see Tables 3 and 4).

4) None of the 10 rabbits immunized with hemolytic streptococci or paratyphoid B gave a positive cat-reaction.

5) On absorption of human sera with M. cat. antigen, it is possible partially to remove the antibodies for a positive gono-reaction.

6) 5 of 8 rabbit sera from animals that were immunized with gonococci alone gave a positive cat.-reaction.

No discussion.

F. K a u f f m a n n, Kopenhagen: *Über neue thermolabile Körper-Antigene der Coli-Bakterien.*

Es werden neue, thermolabile Körper-Antigene der Coli-Bakterien, L-Antigene genannt, beschrieben, die sich vom Vi-Antigen in ihrer

Resistenz und Serologie unterscheiden. Coli-Kulturen mit voll entwickeltem L-Antigen sind *O-inagglutinabel*, werden aber durch ein Serum, das *L-Agglutinine* enthält, agglutiniert. *OL-Immunsereen* können durch Immunisierung von Kaninchen mit *lebenden* Bakterien oder mit Formalin-Bouillonkulturen hergestellt werden. Durch Erhitzung auf 60—100° C. werden die agglutinablen, *agglutininbindenden* und agglutinogenen Eigenschaften der L-Antigene beseitigt; gleichzeitig verschwindet hierbei die O-Inagglutinabilität der Coli-Bakterien. Unter den bisher bekannten Antigenen ist die Labilität der L-Antigene am grössten.

Zur *Widal-Reaktion* mit Coli-Bakterien sind für den Nachweis von O-Agglutininen gekochte Bouillonkulturen, für den Nachweis von L-Agglutininen lebende Bakterien anzuwenden. Zur *serologischen Typenbestimmung* von Coli-Kulturen sind in erster Linie die O- und L-Antigene zu berücksichtigen. Die H-Antigene spielen eine untergeordnete Rolle, da sie oft schlecht entwickelt sind oder fehlen. Coli-Kulturen, aus *Krankheitsfällen* (Urin, Eiter u. s. w.) isoliert, sind häufiger O-inagglutinabel als solche aus Faeces. Die Zahl der serologischen Coli-Typen aus Krankheitsfällen scheint kleiner zu sein als die Zahl der Coli-Typen aus Faeces.

Wir haben es also wahrscheinlich mit einer *bestimmten Gruppe pathogener Coli-Typen* zu tun, die durch eine starke Entwicklung der L-Antigene gekennzeichnet sind. Coli-Kulturen, die dasselbe L-Antigen besitzen, können verschiedene O-Antigene enthalten, sodass man unter Berücksichtigung dieser beiden Körperantigene ein *diagnostisches Antigenschema*, zu dem der Grundstein gelegt wird, aufstellen kann. Es kommt ein *L-Formenwechsel* vor, d. h. es treten selten in O-inagglutinablen Kulturen mit L-Antigenen Kolonien ohne dieses Antigen auf, die O-agglutinabel sind und makroskopisch an ihrer grösseren Durchsichtigkeit erkannt werden können.

Die O-inagglutinablen Formen einer Kultur sind für die Maus von *grösserer Toxizität* als die O-agglutinablen Formen ohne L-Antigen. Die pathogene Wirkung von Coli-Bakterien auf die Maus, die vorwiegend eine *toxische* ist, beruht auf der *kombinierten Wirkung* der O- und L-Antigene. Ob daneben noch andere Toxine vorkommen, erscheint fraglich. Bei der *aktiven und passiven Immunisierung* der Maus sind die L-Antigene von Bedeutung, da dem L-Antikörper eine *besondere, schützende Wirkung* zukommt.

L-Antigene, die eine O-Inagglutinabilität bedingen, kommen auch in der Gruppe *coliähnlicher Bakterien* vor, d. h. bei Stämmen, die Lactose spät oder gar nicht spalten.

Die *»qualitative Rezeptorenanalyse«* darf sich nicht nur auf die Unterscheidung zwischen O- und H-Antigenen beschränken, sondern muss auch die verschiedenen *thermolabilen Körperantigene*, die



sowohl diagnostische als auch immunologische Bedeutung haben, erfassen.

Diskussion:

M. Kristensen fragt nach der Bedeutung dieser Befunde für die Nahrungsmittelvergiftung durch Coli-Bakterien.

F. Kauffmann antwortet, dass er bisher noch keine Gelegenheit hatte, solche Kulturen zu untersuchen, und bittet um Überlassung von geeignetem Material.

V. Friedenreich fragt nach der Coliflora der gesunden Menschen.

F. Kauffmann antwortet, dass er soeben zusammen mit *Beate Perch* eine Untersuchung dieser Frage, über die in einigen Tagen berichtet werden soll, abgeschlossen hat. Das Ergebnis lässt sich folgendermassen zusammenfassen:

1. Im Laufe eines halben Jahres wurden die Faeces von 2 gesunden Versuchspersonen je 14mal auf das Vorkommen verschiedener Coli-Typen hin untersucht. Hierbei wurden aus der ersten Versuchsperson 43 Coli-Stämme isoliert, die zu 10 verschiedenen Serotypen gehörten, während 41 Coli-Stämme aus der zweiten Versuchsperson zu 22 verschiedenen Serotypen gehörten. Da diese Typen auch unter einander verschieden waren, wurden im ganzen unter 8½ Stämmen aus 2 Personen 32 verschiedene Typen festgestellt.

2. Wir haben es beim gesunden Menschen mit einer mannigfaltigen, stark wechselnden Coliflora zu tun und können oft in einer Faecesprobe gleichzeitig mehrere verschiedene Coli-Typen nachweisen.

## ABSTRACTS — ANALYSES — REFERATE

Gerd Habelmann: *Blutverlust Blutersatz*. Die Biologie des Blutverlustes und Blutersatzes mit Frischblut, konserviertem Blut und Serum unter besonderer Berücksichtigung der Knochenmarksreaktionen. 255 S. 75 Abb. RM 13,95. Georg Thieme (Verlag) Leipzig 1942.

Verf. macht den interessanten Versuch, die Wirkung der Transfusion als ein aktives Eingreifen in die Funktion des Knochenmarkes zu erklären. Als Grundlage hierfür dient ein Vergleich von Blut und Knochenmarkspunktat, entnommen vor und nach Transfusion bei Patienten mit Blutungs- und Tumoranämien. Es wurden die üblichen hämatologischen Routinemethoden angewandt.

Die Wirkung der Anämie auf das Knochenmark kann entweder in der Erzeugung einer Knochenmarksinsuffizienz — einer Art aplastischer Anämie — oder einer Knochenmarkssperre (Ausschwemmungssperre) bestehen, wobei die letztere vermutlich auf intermediäre Stoffwechselprodukte während der Anoxyhämie zurückzuführen ist. Die Diagnose dieser Zustände ergibt sich, wenn man Blutbild und Knochenmarkspunktat zusammenhält. Extreme Linksverschiebung im Blut und Knochenmark zugleich mit Zellenarmut im Knochenmark deuten auf Insuffizienz hin. Ein aregeneratives Blutbild, das von einem Knochenmarksbild mit deutlicher, je nach der Dauer des Zustandes rechts-, linksverschobener oder normaler Produktion begleitet ist, deutet auf eine Sperre hin.

Die Wirkung der Transfusion auf die Knochenmarksinsuffizienz wird nun in der Weise erklärt, dass die »überschwellige« Anforderung an die Produktion vermindert wird, sodass die Erythropoiese in Ruhe vor sich gehen kann. Die Lösung der Sperre, welche momentan geschieht und sich in einer Umstimmung des Knochenmarkbildes mit Normoblastensturz im Mark und Normoblastenkrise im Blut zeigt, wird durch den verbesserten Sauerstofftransport erklärt.

Konserviertes Blut hat eine besonders günstige Wirkung auf eine Knochenmarkssperre, ist jedoch weniger effektiv bei Insuffizienz.

Die Bestrebungen des Verf.'s, dem viel umstrittenen Reizeffekt der Bluttransfusion eine pathophysiologische Erklärung zu geben, sind sehr anregend; aber da die Beweise auf der quantitativ sehr unsicheren Punktionsmethode beruhen, würde eine mehr ausführliche Beweisführung als die 24 äusserst kurzgefassten Krankengeschichten von grossem Wert gewesen sein, speziell da die Anschauungen des Verf.'s über die Physiologie des Knochenmarks, die Lebensdauer der Blutkörperchen in der Blutbahn und die Bedeutung der Anoxyhämie bei moderaten Anämien ein stark subjektives Gepräge tragen.

Die Arbeit weist Thieme's gewohnte, vortreffliche Ausstattung auf, wird aber von einer Anzahl Druckfehlern entstellt.

*Poul V. Marcussen.*

## OSTEOSCLEROTIC ANEMIA IN A BOY OF 17 MONTHS

By *Bent Andersen* and *Tage Lund*.

(Received for publication May 25th 1942.)

### *Introduction.*

The osteosclerotic diseases of the blood are characterized by changes in the blood and generalized osteosclerosis. The etiology and pathology are obscure, no effective treatment is known, and the prognosis is very poor.

The changes in the blood are of very diverse nature. Several authors have attempted a classification after the hematological findings, but this meets with great difficulties because the blood pictures are often quite atypical. Leukemic and »pseudoleukemic« conditions have been described as well as hemorrhagic aleukemia, anemia, thrombopenia and polycythemia.

Pathologic-anatomically the spongiosa is found to be greatly thickened, and there is a more or less advanced obliteration of the medullary cavity, even in the middle of the shaft of the long bones. Histological examination shows that the bone-marrow in the remaining medullary cavities often is fibrous in some areas and normal or hyperplastic in others. Further, extramedullary hematopoiesis is seen in many cases.

Of the few available X-ray examinations of the skeleton

the one reported by Kristian Overgaard (10), we think is to be pointed out as the most complete. This was the case of a woman, aged 41, suffering from osteosclerotic anemia. All the bones were found to be of normal form externally, without any demonstrable thickening of the corticalis. The changes involved almost exclusively the spongiosa, the trabeculae of which were very coarse, giving an intense shadow. The osseous structure was recognizable everywhere, and the osseous tissue presented nowhere the homogeneous appearance typical of Albers-Schönberg's disease.

Whether these osteosclerotic diseases of the blood differ fundamentally from Albers-Schönberg's disease cannot be decided for certainty, but in various respects they are strongly divergent.

Albers-Schönberg's disease is characterized especially by a tendency to fracture and by the typical X-ray picture. Also its etiology and pathogenesis are obscure. It has a tendency to familial occurrence and it is seen not infrequently in consanguineous relatives. It is diagnosed most often in childhood. Besides the above-mentioned symptoms there may be pectus carinatum, caput quadratum and irregular dentition. Roentgenography shows marked increase in the density of the bones together with disappearance of the normal structure. The medullary cavity is usually narrowed, if visible at all. In advanced cases the long bones show a clubshaped thickening, in particular of the proximal end of the humerus and distal end of the femur. Further, there is usually a demonstrable thickening of the posterior clinoid processes and a diminution of the sella turcica. Blindness may result from narrowing of the optic foramina and optic atrophy. Autopsy shows marked osteosclerosis with obliteration of the medullary cavity (usually resulting in hypochromic anemia). In some cases there has been moderate enlargement of the lymph glands, liver and spleen, besides evidence of hematopoiesis in these organs. The number of white blood cells and platelets in the peripheral blood is usually normal.

The morbid conditions mentioned here deviate consider-

ably on several points. The osteosclerotic diseases of the blood make their clinical appearance as hematological affections and most often the skeletal changes are not revealed before autopsy, whereas Albers-Schönberg's disease as a rule discloses its presence by the occurrence of fractures. The osteosclerotic diseases of the blood are not of familial occurrence and hitherto they have been diagnosed almost entirely in adults, and are not accompanied by blindness. Finally the two lesions differ markedly in their roentgenographic features.

The osteosclerotic diseases of the blood have been the subject of several excellent papers (1, 3, 8, 11, 13) to which the reader is referred.

In the following an account will be given of the case of a boy, 17 months old, whose case history gave us considerable difficulties; and in this connection, mention will further be made of two cases of similar nature in children that have been reported previously.

### *Case History.*

The patient was a boy, 17 months old, who was transferred to the Dep. of Pediatrics from the Viborg County Hospital. From his case record in that hospital and from the information given this department by his parents, the following data may be cited:

The father is 35 years old, the mother 37, and both are well. The family history is of no interest in this connection. The patient is No. 7 of 8 children. He weighed 4000 g. at birth, and he was breast-fed for 1 month. His present diet is as follows: At 8 o'clock, oatmeal porridge with butter and milk. At 10, gruel. At 12, potatoes and gravy. At 15, gruel. At 19, porridge and 1 egg. In the winter of 1940—41 he was given altogether about 400 g. of cod liver oil.

The patient is said to have been well until the onset of the present illness, which commenced 10—12 days before his admission to the Viborg Hospital. He was then cross and indisposed, with loss of appetite, and sleeping a great deal.

A couple of days later, small red spots appeared here and there on the skin, and blue spots on the legs. On admission to the Viborg Hospital, petechiae of varying size were seen on the trunk and extremities, also subconjunctivally and on the mucous membrane of the palate. Numerous small ecchymoses, especially on the lower extremities, and bleeding from the gums. There was universal enlargement of lymph glands, but no enlargement of the liver or spleen; no jaundice. There was rickety rosary, and enlargement of epiphyses. Roentgenography of the hands and knees showed rather severe rickets.

Examination of the blood: See Table 1.

Table 1.

Blood Picture of the Patient. Early in the Disease.

Date	14/6	21/6	22/6	30/7
Hemoglobin	57	35	32	53
Red blood cells		2.4	2.89	2.44
White blood cells	8320	9800	13640	12600
Polynuclears	67	25	14	32
Eosinophils	0	0	0	0
Lymphocytes	29	73	78	61
Monocytes	4	2	8	4

*Remarks.* 21/6: From the appearance of the nuclei and their size, some of the lymphocytic cells look immature. Only a couple of thrombocytes are seen in the smear. Only faint signs of regeneration.

30/7: No platelets in the smear. Many of the lymphocytes are larger than ordinary lymphocytes, but not resembling lymphoblasts.

During his stay in the Viborg Hospital the petechiae varied a great deal in number. After a slight incision in the lobe of the right ear there was a hemorrhage that was difficult to stop. In addition, occasional bleeding from the mouth and lips, and sugillations at the sites of the intramuscular injections given. The temperature was elevated almost throughout his stay in the hospital, a few times even markedly increased.

The general condition was periodically poor. The appetite as a rule not good. He was treated with ascorbinic acid, iron, hepsol, intramuscular injections of blood. In addition, on account of the rickets, he was given 2 cc. of ultranol fortior by mouth (500,000 I.U. of vitamin D).

On admission to the Dep. of Pediatrics of the Aarhus City Hospital he was a little emaciated (weighing 9480 g.), very pale, but able to sit and walk without support. No jaundice. Rickety rosy and slight enlargement of epiphysis. Anterior fontanelle measuring 2 × 2 cm. Slightly enlarged and freely movable lymph glands palpable in the neck, axillae and, especially, inguina. No enlargement of the liver and spleen. Petechiae and ecchymoses as mentioned above. Blood examination, see Table 2.

Table 2  
Blood Picture of the Patient Enter in the Disease

Date	Dec.	Jan.	II 9
Hemoglobin	62	52	62
Red blood cells	2.97	2.67	2.9
White blood cells	27,000	27,000	10,000
Cell volume	77	77	78
Polynuclears	17.5		16
Eosinophils	1		0.5
Monocytes	1		1.5
Small lymphocytes	13.5		13.5
Large, young lymphocytes	1		10.5
Blasts	1		2.5
Atypical cells	1		2.5
Platelets		seen	

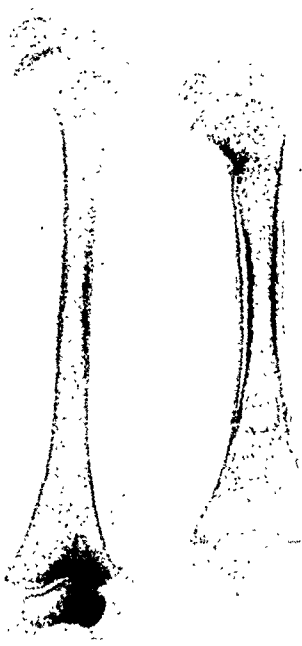
*Remarks Dec.* Two normoblasts per 100 white blood cells. Only very few platelets. The cells designated as "atypical" resembling monocytes, with greyish blue protoplasm, which is dense but, and no granules. The nucleus is large, round or kidney shaped, with loose chromatin and a few nucleoli. The platelets are typical, with a narrow rim of strongly basophil protoplasm, large round nucleus with loose chromatin and nucleolus nucleoli, no granules.

*II 9.* Two normoblasts per 200 red blood cells. Very few platelets.



*Sternal puncture (smear):* Marked increase in reticulum cells and plasma cells at the expense of the cells in the myeloid and erythropoietic system. In a couple of areas reticulum and plasma cells form clusters of 3—5 cells and present no morphological abnormality. Several cells are seen that cannot be rubricated with certainty. They have oval nuclei of loose structure, with 3—6 nucleoli and non-granular, slightly basophil protoplasm, sometimes with delicate offshoots. These cells are probably hemohistocoblasts. There are a few, but unquestionable, myeloblasts, and only very few typical, granular myelocytes, whereas staff nuclear and segmented leucocytes are present in normal number. The erythropoietic system is represented but most scantily. Only a few basophil and polychromic erythroblasts are seen, together with some normoblasts. Megakaryocytes appear to be present in normal number. Lymphocytes normal.

*Roentgenography of the Skeleton and Lungs.* The most pro-



*Fig. 1.*

Roentgenogram of the longitudinally divided femur of the patient (at the right) and of a longitudinally divided normal femur from a patient at the same age.

nounced changes are seen in the long bones, especially the femurs. Hence these are described as the prototype.

*Femur:* The entire diaphysis is greatly thickened from heavy periosteal deposits. Apart from an outward convex curvature of the bone and the plumpness of the diaphysis, no changes in form are found. The periosteal deposits are most pronounced on the medial surface of the bone, where they reach a maximal thickness of 5 mm. They consist in up to 4 lamellar layers, dense and close-packed. The original corticalis is defined somewhat unsharply against the medullary cavity. The periosteal deposits subside gradually towards the metaphyses and cease completely, with a rather sharp limitation, at the transition between diaphysis and metaphysis, giving the diaphysis a somewhat sclerotic appearance as compared to the metaphysis. In the diaphysis the structure of the spongy bone is coarser in pattern than normally, the individual trabeculae being thicker, the meshwork more open and irregular, but not effaced. A similar picture is presented by the epiphyseal nuclei. In the metaphysis, on the other hand, the structure is extraordinarily delicate, forming a fine-meshed network which barely can be made out. The epiphyseal line stands out sharply; it is regular. The changes in the femora are symmetrical. Essentially the same conditions are seen in the tibia, humerus and ulna, whereas the changes are less pronounced in the fibula and radius.

*Skull:* No abnormality. *Vertebral column, thoracic and lumbar:* In the bodies of the lower thoracic vertebrae and all the lumbar vertebrae the bony structure is somewhat coarse. *Wrists and hands:* Epiphyseal lines sharply defined and lime-containing; epiphyses normal in form. No abnormality, especially no periosteal reaction of the bones of the hands. *Lungs and heart:* No abnormality. Delicate periosteal deposits seen along the edges of the ribs. Bony structure of the scapula coarse.

*Conclusion:* The roentgenograms thus show symmetrical changes, the predominant feature of which consists in pronounced periosteal deposits and a coarse-meshed structure of the spongiosa in the diaphyseal section of the long bones. No evidence of florid rickets. The changes are quite uncharacteristic of Albers-Schönberg's disease, but suggestive of the changes observed in connection with certain diseases of the blood.

(Signed. Refslund Poulsen.)

*Wassermann* negative. *Urine*: No abnormal elements.

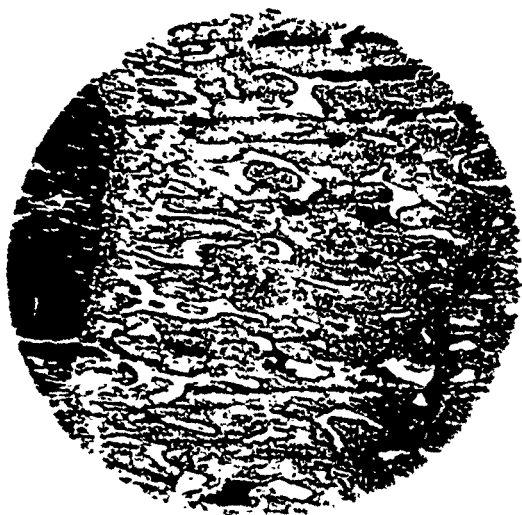
The temperature was continuously elevated. Now and then new petechiae appeared and there was a little bleeding from the lips almost daily. The general condition of the patient was surprisingly good till the very day when he died from epistaxis and voluminous hemorrhagic vomiting.

*Autopsy*: Slight hyperplasia of the bronchial and mesenteric lymph glands. Small, subpleural, subpericardial and sub-endocardial hemorrhages. *Spleen*: Weight 80 g. (normal about 50 g.); cut surface uniform, red velvety; follicles inconspicuous. *Liver*: Weight 407 g. (normal about 400 g.). Organs apparently normal.



*Fig. 2.*

Photo of the longitudinally divided femur of the patient (at the right) and of a longitudinally divided normal femur from a patient at the same age.



*Fig. 3.*

Microphoto of the distal epiphyseal line of the femur. At the left, the epiphyseal line. At the right, transition from cellular marrow to fibrous marrow. Magnif  $\times 25$ .



*Fig. 4.*

Microphoto of the epiphyseal line, same specimen as in Fig. 3. Magnif.  $\times 110$ . — Note the perfectly normal structures, 10 weeks after administration of ultranol fortior for severe rickets.

*Femur:* Longitudinal section shows regular epiphyseal line. The juxta-epiphyseal part of the diaphysis shows a rather small zone of red bone-marrow and fine pattern of spongy bone, regular. With a rather sharp transition, the bone-marrow then becomes pale, and the medullary cavity decreases in size, the trabeculae and corticalis becoming thicker, almost completely compact in the middle half of the diaphysis. The diaphysis further shows a double contour, most pronounced in the middle, the corticalis being coated by a regular periosteal deposit. The epiphyseal nuclei in the proximal and distal ends of the bone are pale, only a little reddish.

*Sections of the epiphyseal line* (Figs. 3 and 4) show the epiphyseal cartilage to be normal in structure, with regular columnar arrangement of the cells, pointing towards the epiphyseal lines. The enchondral ossification is normal, and numerous osseous trabeculae, a little narrow, lined with osteoblasts are being formed. The spaces between the osseous trabeculae contain cellular bone-marrow, forming a marginal zone of about 1 cm. with lively erythro- and myelopoiesis. After this, the bone-marrow shows a gradual transition to fibrillary connective tissue (Fig. 5) with scattered small foci of



*Fig. 5.*

Microphoto of the section of the proximal part of the metaphysis of the femur. Fibrous marrow and coarse osseous trabeculae. Magnif.  $\times 110$ .

erythropoietic and myelopoietic tissue, which is becoming increasingly scanty with increasing distance from the epiphyseal line. Here and there, however, cell-rich areas are encountered, consisting in clusters of large, immature cells that resemble hemocytoblasts, and also occasional areas and streaks rich in cells that are somewhat



Fig. 6.

Macrophoto of section from the middle of the diaphysis of the femur.

elongated, rich in protoplasm and approaching reticulum cells in character. At the same time as the marrow becomes fibrillary and poor in cells, the osseous trabeculae become thicker and more plump, presenting a regular lamellar structure, with no lacunar breakdown, and no osteoclasts are seen here. On the other hand, the osseous trabeculae are lined with osteoblasts.

In the *middle part of the diaphysis* (Fig. 6) the medullary spaces are almost completely obliterated, the osseous trabeculae being fused into almost compact masses. The small canal-like, medullary spaces contain fibrillary connective tissue and a layer of osteoblasts lining the bone tissue. Here and there, delicate and thin streaks of cells are seen. In addition, the entire diaphysis shows a pro-

nounced periosteal ossification, the compact bone being enveloped throughout by a layer of fine-meshed spongy osseous tissue, coated externally by periosteum. This layer of spongy bone presents regular, somewhat small, osseous trabeculae, and the intermediate medullary spaces contain a fine-fibrillary loose connective tissue: the osseous trabeculae are lined with osteoblasts. Here and there between this periosteal osseous layer and the compact bone, there are irregular, small, crevice-like, medullary spaces which show not infrequently areas of rather extensive necrosis; but these necrotic areas are often surrounded by a good many cells, erythrocytes and granular cells, together with lymphocytes. On account of the decalcification of the tissue, however, these cells are somewhat difficult to determine. The *epiphyseal nuclei* show quite similar changes.

*Bone-marrow from bodies of vertebrae:* The marrow is rather dense, without fat-cells, undergoing beginning transformation into fibrillary connective tissue — a change that is more pronounced in some areas in streaks, where the marrow is poorer in cells. On the whole, the number of erythrocytes is very scanty, and also polynuclear leucocytes are extraordinarily scanty. There are numerous cells of a quite immature character, resembling mostly hemocytoblasts. There are relatively few erythroblasts, but several polychromic erythroblasts and normoblasts. Many myeloblasts and myelocytes are seen, but, as mentioned, only exceedingly few leucocytes. No megakaryocytes are seen.

*Spleen:* The pulp contains lymphocytes and a good many quite immature cells of hemocytoblastic type; also small heaps of myelocytes, besides small foci with polychromic nuclear erythrocytes and ordinary normocytes, together with a few erythroblasts. *Liver:* The capillaries contain rather numerous, large, immature cells of hemocytoblastic type, besides a few myeloblasts and a few erythroblasts, normocytes and normocytes with evacuation of the nuclei. *Lymph glands:* The structure is preserved, but the sinuses contain numerous erythrocytes; in addition there are small foci with normocytes, a few erythroblasts and a few large, polychromic nucleated cells. Furthermore there are a few myelocytes and several myeloblasts. *Sinus:* Normal structure. There are extraordinarily many eosinophil myelocytes in the interlobular septa, and often a good many of these cells within the medulla itself and in the cortical tissue. No erythropoietic foci. *Kidneys:* Only a few and very small myelopoietic foci. *Suprarenals:* No abnormality.

*Summary:* The microscopic examination shows a marked endosteal and periosteal osteosclerosis, together with a fibrous

transformation of the bone-marrow with very marked reduction of the myelo- and erythropoietic tissue; pronounced extramedullary myelo- and erythropoiesis in the lymph glands; insignificant myelo- and erythropoiesis in the spleen; and numerous hemocytoblasts are seen in the liver. In the bone marrow, very few mature cells are seen but numerous quite immature cells, mostly of hemocytoblastic type. The picture of the lesion does not resemble any form of leukemia, but is rather suggestive of an anemia due to the osteosclerosis and fibrous transformation of the bone marrow.

(Signed. Tage Lund.)

### *Discussion.*

We were not able to make definitive diagnosis, but the anemia, thrombopenia, hemorrhagic diathesis, enlargement of lymph glands, lymphocytosis and immature cell forms in the peripheral blood, the fever and the rapid, fatal course were suggestive of an aleukemic lymphatic leukosis — a diagnosis that found additional support in the presence of the periosteal deposits. On the other hand, the quite atypical sternal punctate was not indicative of leukemia. All told, then, the diagnosis was very uncertain. The description of the roentgenograms given in the case history resulted from a revision of the pictures after the autopsy findings had been reported. The first description, given before the death of the patient, dealt almost exclusively with the periosteal deposits, whereas the changes in the structure of the bones had not been noticed. Naturally, therefore, we concentrated our attention on these deposits trying to find out whether they might somehow be associated with other features of the lesion.

In recent years a good deal has been written about osseous changes in leukemia. Skeletal changes in children suffering from leukemia have been found very often, roentgenographically as well as pathologic-anatomically. Thus, in



pathologic-anatomical studies (7, 14), among other things, osteoporosis of the metaphyses has been demonstrated, together with subperiosteal new-formation of bone. Similar observations have been made in roentgenographic studies (2, 9, 12). Willi (14) emphasizes that the clinical diagnosis is often difficult in these cases, because the lesion often takes an aleukemic course with an uncharacteristic blood picture and as the enlargement of lymph glands and spleen is often very slight or completely absent.

Our patient presented pronounced periosteal deposits, and in addition, at the first consideration of the roentgenograms, we thought we were able to make out an osteoporosis of the metaphyses of the long bones. Subsequently we realized that the metaphyses really were rather to be looked upon as normal, while the diaphyses were sclerotic. But, prior to the autopsy we regarded the roentgenographic finding as supporting the diagnosis leukemia.

Periosteal deposits surrounding the long bones throughout may be seen in rickets, too. They become visible in the roentgenogram when lime salts are deposited in the osteoid tissue on improvement and recovery of the patient. Our patient had had a rather severe degree of rickets for which he had been treated with 2 cc. of ultranol fortior (500,000 I. U. of vitamin D). X-ray examination of the epiphyses of the wrist and knee joint, 10 weeks later, showed absolutely no sign of rickets, but marked periosteal deposits. We shall not venture to decide whether such deposits may be encountered at a point of time when the epiphyseal rickets is cured; but the possibility cannot be refuted that the deposits may be due to rickets. In some respects the endosteal bone changes reminded in no slight degree of the changes found by Harris & Innes (6) in rats on moderate overdosage with vitamin D, namely; stimulation of the osteogenesis, intensive calcification of the epiphyseal cartilage and formation of abnormally long and slender trabeculae extending into the medullary cavity and leading to almost complete obliteration of this cavity. We find it unreasonable to assume, however.

that the osseous changes in our patient might be due to the energetic antirachitic treatment of the patient. This view finds support, among other things, in the fact that the disease had commenced before the patient had received any large amount of vitamin D; furthermore, a quite similar morbid picture has been described at a point of time when »massive treatment« of rickets was unknown. Finally, in recent years, this form of treatment has been employed widely, apparently without any injurious effect.

That the periosteal deposits might be due to syphilis or scurvy may be regarded as excluded.

Finally, mention is to be made of the periosteal deposits of unknown origin described by v. Chiari (4). On roentgenography of 81 non-selected children, free from syphilis and rickets, in the first six months of life, 21 showed marked periosteal deposits; and these infants presented no other sign of any bone lesion or of any other disease except that some of them were suffering from pyoderma. We have no personal experience whatever that would enable us to appreciate this observation.

As mentioned, we were not able to make any clinical diagnosis in this case. The autopsy gave us a more solid foundation for the diagnosis, insofar as it made it possible to characterize the affection as an osteosclerotic disease of the blood, although it has to be admitted that its etiology and pathogenesis are still quite obscure.

In one respect the clinical picture presented by our patient differs from the one described in adult patients, namely, the presence of the marked periosteal deposits, as this phenomenon is absent in adult patients, in whom the new-formation of bone is entirely endosteal.

Osteosclerotic diseases of the blood appear to be extremely rare in children, that is, when we leave the typical Albers-Schönberg disease out of the question. Österlin (15) has reported the case of a two-year-old child who presented the following symptoms: anemia, cutaneous hemorrhages, pains in the extremities and oedemata. The white blood count was

11,000 (with 75 % »einkernige« and 25 % polynuclears). Shortly before death the blood picture showed many myeloblast-like cells. The autopsy findings were: Femur very plump, its longitudinal cut surface showed a marked thickening of the corticalis, to twice — in some areas — thrice — the normal thickness. The medullary cavity was greatly decreased, quite obliterated in the diaphyses. Histological examination showed a considerable thickening of the osseous trabeculae, fibrosis of the bone-marrow with a few foci of myeloblast-like elements and myelocytes. Similar changes were found in the humerus, ribs, the calvarium and vertebrae. Lymph glands and the spleen showed myeloid metaplasia. There is a striking resemblance between the morbid features in this case and in ours.

Hässler & Krauspe (7) have described what they call a case of aleukemic myelosis with generalized osteosclerosis. The patient was  $2\frac{1}{4}$  years old. The clinical features were: anemia, thrombopenia, moderate lymphocytosis, and absence of leucocytes. The white blood count was 7200 at the most, 1800 at the lowest. Roentgenography of the bones showed a honeycomb-like structure and marked periosteal deposits. Autopsy revealed extensive endosteal and periosteal new-formation of bone with partial obliteration of the medullary cavities. Microscopic examination showed proliferation of myeloid cell forms in the remnants of the bone-marrow and in all the organs. This case, too, reminds a great deal of that of our patient.

### *Summary.*

Description is given of an instance of osteosclerotic anemia in a boy, 17 months old. The clinical symptoms were chiefly anemia, fever, hemorrhagic diathesis and thrombopenia. Roentgenography of the skeleton showed pronounced periosteal deposits and large-meshed structure of the spongiosa. Autopsy revealed marked endosteal and periosteal osteo-

sclerosis together with fibrosis of the bone marrow (with marked reduction of the myelo- and erythropoietic tissue), besides pronounced extramedullary myelo- and erythropoiesis in the lymph glands.

## REFERENCES

1. Askanazy, M.: Henke, F. & Lubarsch, O.: Handb. d. spez. pathol. Anat. & Histol. Vol. IX/3, p. 76 ff. 1937.
2. Baty, J. M. & Vogt, E. C.: Am. J. Roentgenol. 34: 310, 1935, cit. after (9).
3. Chapman, E. M.: Am. J. Med. Sc. 185: 171, 1933.
4. Chiari, O. v.: Arch. f. Kinderh. 115: 66 and 149, 1938.
5. Guldager, A.: Hypervitaminosis D. Dissert. Copenhagen, 1936.
6. Harris, L. J. & Innes, J. R. M.: Bioch. J. 25: 366, 1931, cit. after (5).
7. Hässler, E. & Krauspe: Virch. Archiv. 290: 193, 1933.
8. Mettier, S. R. & Rusk, G. Y.: Am. J. Pathol. 13: 377, 1937.
9. Nelson New Loose-Leaf Med. Vol. 4, p. 87 H.
10. Overgaard, K.: Acta Radiol. 16: 51, 1936.
11. Schmidt, M. B.: Henke, F. & Lubarsch, O.: Handb. d. spez. pathol. Anat. & Histol. Vol. IX/3, p. 76 ff. 1937.
12. Snelling, C. E. & Brown, A.: Arch. Dis. Childhood. 9: 315, 1934.
13. Wolf, Ch.: Zieglers Beiträge, 89: 151, 1932.
14. Willi, H.: Die Leukosen im Kindesalter. Berlin 1936, S. Karger.
15. Österlin, E.: Virchows Arch. f. path. Anat. 247: 589, 1923.

## ANWENDUNG VON MUCIN-INFEKTIONEN ZUR UNTERSUCHUNG VON SERUM GEGEN GIFTARME DYSENTERIE-BAKTERIEN

Von V. Sindbjerg-Hansen.

(Eingegangen bei der Redaktion 12. Juni 1942.)

Während man sich über den therapeutischen Wert des spezifischen antitoxischen Serums gegen Shiga-Kruse-Dysenterie ziemlich einig ist, sind die Auffassungen verschieden mit Bezug auf die Serumbehandlung der von den verschiedenen Typen des Flexnerbazillus verursachten Dysenterie.

Einige Autoren, wie *Jacob, Josephs & Davison, Gänsslen* u. a., messen der Serumtherapie bei diesen Infektionen keinen besonderen Wert bei, während andere, z. B. *Coyne & Auché, Ruffer & Willmore, Klein, Kuhle*, eine gute Wirkung bei Anwendung genügend grosser Dosen polyvalenten Serums gesehen haben. Mit Rücksicht auf das Aufklappen der Ruhr in Kriegszeiten haben *Curschmann* und *Zikowsky* kürzlich empfohlen, sofort mit polyvalentem Serum zu behandeln, ohne erst Zeit mit dem Warten auf eine bakteriologische Diagnose zu verlieren, welche letztere besonders unter Kriegsverhältnissen oft nur spät und schwer zu beschaffen ist.

Freilich waren zweifellos die angewandten Sera von sehr verschiedenem Werte, was zum Teil auf die Schwierigkeiten zurückgeführt werden kann, welche die Standardisierung eines polyvalenten Serums bietet. Nur der Gehalt an Shiga-Kruse-Antitoxin lässt

---

Die Arbeit wurde mit Unterstützung von »Froken P. A. Brandts Legat« ausgeführt.

sich durch intravenöse Injektion von Toxin-Antitoxinmischungen in Mäuse und Vergleichen mit einem Standardserum von bekanntem Antitoxingehalt genau bestimmen, in Analogie mit der Standardisierung anderer antitoxischer Sera. Die Messung der antibakteriellen Antistoffe gegen die giftarmen Dysenteriebakterien stösst dagegen auf die Schwierigkeit, dass die Bakterien nur sehr wenig pathogen für Versuchstiere sind. Um eine experimentelle, tödlich verlaufende Infektion zu erzielen, sind so grosse Bakterienmengen erforderlich, dass eine genauere Austitrierung von Heilseren unmöglich wird. Zwar fanden *Felsen & Osofsky* einen Stamm, dessen Dosis minima letalis (d. m. l.) für Mäuse bis auf 0,01 ccm Bouillonkultur gesenkt werden konnte, und bei welchem sie eine gute Schutzwirkung von 0,5 ccm Immunsrum gegen Infektion mit 10 d. m. l. sahen; aber bei weitem die meisten Stämme sind beträchtlich weniger virulent für Mäuse. Andere Untersucher, *Coyne & Auché*, *Ruffer & Willmore*, *Flerner & Amoss*, verwendeten Meerschweinchen, bei welchen die d. m. l. sich in der Regel auf 1—3 ccm Bouillonkultur, intraperitoneal injiziert, belief. Gegen eine nicht zu grosse Anzahl tödlicher Dosen konnte 1 ccm Serum zwar oft beschützend wirken, aber die Unregelmässigkeiten waren so gross und die Methode so grob, dass *Ruffer & Willmore* zu dem Schlusse kamen, es sei schwierig, mit Hilfe von Laboratoriumsmethoden ein zuverlässiges Mass für den Wert des Serums zu finden. Trotz nur bescheidener Ergebnisse bei den Tierversuchen sahen sie eine vortreffliche klinische Wirkung ihres Serums. — Eine wirkliche Nachahmung der menschlichen Ruhrinfektion gelang in einzelnen Fällen *Preston & Clark* bei Affen durch perorale Eingabe von Flexner-Kulturen. Doch war die hierzu erforderliche Menge so ausserordentlich gross, 20—50 ccm Bouillonkultur, dass Seruminjektionen ganz wirkungslos blieben.

Die Folge davon, dass sich also brauchbare experimentelle Infektionen nur so schwer erzeugen lassen, war die, dass polyvalente Dysenterisera, abgesehen von dem Shiga-Kruse-Antitoxin, in der Regel nur nach ihrer Agglutinationsfähigkeit gegenüber verschiedenen Dysenterietypen gewertet werden.

1910 wiesen indessen *Thibault & Rist* nach, dass die von *Miller* schon früher angegebene Methode, mit Hilfe von Schweinemagenmucin Meningokokken für Mäuse infektiös zu machen, sich auch auf den Flexnerbazillus anwenden liess. Diese Autoren untersuchten eine Reihe Flexner-Stämme, die sich alle, wenn auch in verschiedenem Grade, als infektiös erwiesen und eine tödliche Sepsis hervorriefen, wenn sie zusammen mit Mucin intraperitoneal injiziert wurden. Einige Stämme hatten auf diese Weise eine d. m. l. von nur 10<sup>-7</sup> ccm. Gegenüber einer solchen Infektion sah man eine deut-

liche Wirkung von Antiserum. Von einem gut agglutinierenden Serum konnten noch 0,0008 ccm, die 20 Stunden vorher intravenös gegeben worden waren, Mäuse gegen eine Infektion mit 100 d. m. l. beschützen.

Da diese Methodik also die bisher vermisste Möglichkeit einer experimentellen, intravitalen Wertung von antibakteriellen Dysenterieseren zu bieten schien, wurde angenommen, dass es von Interesse sei, teils die Versuche nachzuprüfen, teils sie auch dahingehend zu erweitern, dass sie eine Untersuchung mehrerer verschiedener Typen von Flexnerbakterien und der ihnen entsprechenden typenspezifischen Sera umfassten, um festzustellen, in welchem Grade das Serum eines Typus auf Infektionen von anderen Typen wirken könnte.

Zu den Versuchen wurde ein Flexner-Stamm vom Typ D und einer vom Typ H (Kruse) ausgewählt sowie ein »Mountain WX« (Andrewes und Inman). Diese Stämme zeichneten sich alle durch eine besonders hohe Virulenz in Mucin aus, mit einer d. m. l. von  $10^{-5}$ — $10^{-7}$  ccm. Ohne Mucin betrug die d. m. l. 0,1—0,5 ccm Kultur. Gegen jeden der 3 Stämme wurde ein monovalentes, typenspezifisches Kaninchenserum durch Immunisierung (von 2 Kaninchen für jeden Stamm) mit formalisierter Bouillonkultur hergestellt, indem 0,5, 1,0 und 1,5 ccm mit 5 Tagen Zwischenraum intravenös gegeben wurden. 6 Tage nach der letzten Injektion wurde das Serum gewonnen und nach Zusatz von 0,2 ‰ Chinisol bei  $-7^{\circ}$  aufbewahrt.

Die beschützende Wirkung jedes der 3 Seren gegen Mucin-Infektion mit jedem der 3 Bakterientypen wurde nun untersucht. Zu den Versuchen wurden männliche weiße Mäuse von 18—20 g Gewicht angewandt. Das Serum wurde mit physiologischer Kochsalzlösung in der Weise verdünnt, dass die gewünschte Serummenge sich in einer Verdünnung von 0,5 ccm vorfand, welche Menge den Mäusen dann intraperitoneal eingespritzt wurde. 1 Stunde nach der Serumeingabe wurde die Infektion, ebenfalls intraperitoneal, mit den in 1 ccm Mucinsuspension aufgeschwemmten Bakterien in der bereits früher mitgeteilten Weise (Sindbjerg-Hansen) vorgenommen. Zur

Injektion kamen in diesen Versuchen immer  $10^{-3}$  ccm einer 18-stündigen Bouillonkultur, welche Menge 100—10.000 d. m. l. vorstellte. Unmittelbar nach der Infektion wurden die Mäuse leicht etwas schlapp, begannen aber im Verlaufe einiger Stunden sich wieder zu erholen. Wenn die eingegebene Serummenge eine völlige Schutzwirkung hatte, waren die Mäuse in der Regel nach 12—24 Stunden wieder munter; war dagegen die Serumdosis unzureichend, ging es ihnen bald wieder schlechter, und sie verendeten an Sepsis, in der Regel 20—48 Stunden nach der Infektion, auf jeden Fall spätestens am 4. Tage. Die überlebenden Tiere wurden 7 Tage lang unter Beobachtung gehalten. Bei allen verendeten Mäusen wurde die Flexner-Infektion als Todesursache verifiziert, entweder durch Aussaat aus dem Herzblut oder durch mikroskopische Untersuchung von nach Gram gefärbten Trockenpräparaten des Peritonealexsudates. In fast allen Fällen fanden sich die Bakterien in ungezählten Mengen vor und wurden in den Blutkulturen mittels der Objektträgeragglutination als Flexnerbakterien bestätigt. Mäuse, die an anderen Ursachen eingegangen waren, sind aus dem Materiale weggelassen worden.

*Versuchsergebnisse:* Zuerst wurde die Wirkung der 3 Serien gegen Infektion mit dem D-Typus untersucht. Nach einem kleinen Vorversuch mit einer geringeren Anzahl Mäuse, durch den die annähernd kleinste beschützende Dosis gefunden wurde, wurden fallende Serummengen der verschiedenen Sera Gruppen von 6 oder — bei den äussersten Werten — 3 Mäusen injiziert. Die Infektion wurde, wie erwähnt, 1 Stunde später vorgenommen, wobei darauf geachtet wurde, dass diejenigen Mäuse, die das Serum zuerst bekommen hatten, auch zuerst infiziert wurden usw., sodass die Zeitspanne zwischen den 2 Injektionen soweit wie möglich für alle Mäuse die gleiche wurde. Das Ergebnis des Versuches ist aus Tabelle I zu ersehen.

Es zeigt sich, dass das homologe D-Serum eine kräftige Schutzwirkung hatte, mit einer niedrigsten voll beschützenden Dosis von ca. 0,0001 ccm. Ungefähr die gleiche Schutzwirkung hatte das WX-Serum. Sehr auffällig war dagegen,



Tabelle I.

Infektion mit Typ D,  $10^{-3}$  in 1 ccm Mucin.

Serum-dosis	D-Serum			H-Serum			WX-Serum		
	Anzahl Mäuse	Ge-storb.	% ge-storb.	Anzahl Mäuse	Ge-storb.	% ge-storb.	Anzahl Mäuse	Ge-storb.	% ge-storb.
0.3				3	3	100			
0.1				6	5	83			
0.03				6	6	100			
0.01				6	6	100			
0.003				3	3	100			
0.001	3	0	0				2	0	0
0.0003	5	0	0				6	0	0
0.0001	6	1	17				6	4	67
0.00003	6	4	67				6	4	67
0.00001	3	3	100				3	3	100
0	6	6	100						

dass das H-Serum sich als fast ganz wirkungslos erwies; nicht einmal 0,3 ccm unverdünntes Serum konnten die Tiere retten, sie vermochten jedoch den Tod ein wenig zu verzögern. Derselbe trat bei den nicht-serumbehandelten Kontrollen nach durchschnittlich 25 Stunden ein, bei den mit 0,3 ccm H-Serum behandelten Tieren nach 35 Stunden.

Danach wurden dieselben 3 Sera gegenüber einer Infektion mit dem H-Typus nach ganz der gleichen Methode wie oben untersucht. Tabelle II zeigt das Versuchsergebnis.

Es geht hieraus hervor, dass sowohl das homologe H-Serum als auch das WX-Serum eine gute Schutzwirkung hatten, während nicht einmal die grösste Dosis D-Serum die Infektion zu überwinden vermochte. Doch wurde auch hier der Tod der Mäuse einige Stunden verzögert.

Schliesslich wurde die Beeinflussbarkeit der WX-Infektion durch die 3 Sera untersucht, wie aus Tabelle III zu erschen ist.

Tabelle II.

Infektion mit Typ H,  $10^{-3}$  in 1 cem Mucin.

Serum-dosis	D-Serum			H-Serum			WX-Serum		
	Anzahl Mäuse	Ge-storb.	% ge-storb.	Anzahl Mäuse	Ge-storb.	% ge-storb.	Anzahl Mäuse	Ge-storb.	% ge-storb.
0.3	6	6	100						
0.1	6	6	100						
0.03	6	6	100						
0.01				3	1	33	3	0	0
0.003				6	2	33	5	0	0
0.001				6	4	67	6	3	33
0.0003				6	6	100	6	5	83
0.0001				3	3	100	3	3	100
0	6	6	100						

Die Anzahl der Mäuse war in diesem Versuche etwas kleiner als in den vorhergehenden, aber reichte doch aus, um eine ausserordentlich kräftige Wirkung des homologen WX-Serums sowie auch eine beträchtliche beschützende Fähigkeit

Tabelle III.

Infektion mit Typ WX,  $10^{-3}$  in 1 cem Mucin.

Serum-dosis	D-Serum			H-Serum			WX-Serum		
	Anzahl Mäuse	Ge-storb.	% ge-storb.	Anzahl Mäuse	Ge-storb.	% ge-storb.	Anzahl Mäuse	Ge-storb.	% ge-storb.
0.01	3	0	0	3	0	0			
0.003	3	0	0	3	0	0			
0.001	5	0	0	5	2	40			
0.0003	5	1	20	5	5	100			
0.0001	4	3	75	3	3	100	3	0	0
0.00003							4	0	0
0.00001							5	3	60
0.000003							3	3	100
0	3	3	100						

sowohl des D- als auch des H-Serums gegenüber dieser Infektion zu zeigen. —

Aus den gesamten Versuchsergebnissen geht in erster Linie hervor, welcher entscheidende Unterschied zwischen den gegen die D-Infektion und den gegen die H-Infektion wirksamen Antistoffen besteht. Das typenspezifische, monovalente D- oder H-Serum enthält, trotzdem es reichlich effektiven Antistoff gegen den homologen Typ besitzt, so gut wie keinen Antistoff gegen den anderen Typus. Das stimmt mit dem von *Kauffmann* auf der Grundlage von Agglutinationsuntersuchungen aufgestellten Antigenschema überein, welchem zufolge zwischen dem D- und dem H-Typus nur eine sehr geringe Antigengemeinschaft besteht, während der WX-Typ mehrere Teilantigene teils mit dem D-Typus und teils mit dem H-Typus gemeinsam hat.

Als praktische Konsequenz aus den Versuchen ergibt sich eine verstärkte Unterstreichung der Notwendigkeit, polyvalente Dysenterieseren zu therapeutischen Zwecken unter peinlicher Berücksichtigung aller im Anwendungsbereich vorkommender Typen herzustellen. Nach *Bojlén* sind sowohl in Dänemark als auch in England und Deutschland die meisten Flexner-Infektionen vom D- oder H-Typ, doch trifft man auch häufig andere Typen an. Gegenüber experimentellen Mucin-Infektionen mit allen diesen Typen dürfte sich die Polyvalenz und Effektivität der Heilsera bewerten lassen. Aus weiteren Versuchen, die später veröffentlicht werden sollen, geht nämlich hervor, dass die sonst angewandte Bewertungsmethode mittels Agglutination Resultate gibt, die nicht immer in Übereinstimmung mit der beschützenden Wirkung in Tierversuchen mit Mucin stehen. Es wäre zu begrüßen, wenn man auf diesem Wege zu einer internationalen Standardisierung der antibakteriellen Dysenteriesera gelangen könnte, wobei mit der Schutzwirkung eines Standardserums in der gleichen Weise verglichen werden müsste, wie es bei anderen antibakteriellen Seren der Fall ist.

## Zusammenfassung.

Die Pathogenität des gegenüber Mäusen nur wenig virulenten *B. dysenteriae* Flexner liess sich durch intraperitoneale Infektion mit Schweinemagenmucin a. m. *Miller* in einem solchen Grade erhöhen, dass die d. m. l. bis zu  $10^6$ mal herabgesetzt wurde. Homologes Antiserum gab, wenn es vor der Infektion intraperitoneal injiziert wurde, eine ausgesprochene beschützende Wirkung gegen die sich sonst entwickelnde tödliche Sepsis. Von 3 monovalenten, typenspezifischen Seren, einem Anti-D-, einem Anti-H- und einem Anti-WX-Serum, zeigte indessen nur das WX-Serum einen sicheren Schutz gegen Infektionen mit allen entsprechenden 3 Bakterientypen. Das D-Serum beschützte dagegen nicht gegen Infektion mit dem H-Typus, und das H-Serum war wirkungslos gegen D-Infektion. Auf Grund dieser Beobachtungen wird hervorgehoben, wie wichtig es ist, dass polyvalente Dysenterie-Sera zu therapeutischen Zwecken durch Immunisierung mit allen im Anwendungsbereich vorkommenden Typen von Dysenteriebakterien hergestellt werden.

## LITERATUR.

- Bojlén, K.*: Dysentery in Denmark. Disputats, Kobenhavn 1934.  
*Coyne, P. & Auché, B.*: Rev. Med. 27, 1129, 1907.  
 — C. R. Soc. Biol. 64, 829, 1908.  
*Curschmann, H.*: Med. Klin. 35, 1473, 1939.  
*Felsen, J. & Osofsky, A. G.*: J. Infect. Dis. 63, 298, 1938.  
*Flexner, S. & Amoss, H. I.*: J. Exp. Med. 21, 515, 1915.  
*Gänsslen, M.*: Deutsch. Med. Wschr. 67, 455, 1941.  
*Jacob, L.*: Münch. Med. Wschr. 65, 640, 1918.  
*Josephs, H. W. & Davison, W. C.*: J. A. M. A. 77, 1863, 1921.  
*Kauffmann, F.*: Acta Path. & Microbiol. Scand. 19, 53, 1942.  
*Klein, B. G.*: Lancet II, 775, 1919.  
*Kuhle, W.*: Deutsch. Med. Wschr. 49, 645, 1923.  
*Miller, C. P.*: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 32, 1136, 1935.  
*Preston, W. S. & Clark, P. F.*: J. Infect. Dis. 63, 238, 1938.  
*Ruffer, M. A. & Willmore, J. G.*: Brit. Med. J. II, 1519, 1910.  
*Sindbjerg-Hansen, V.*: Acta Path. & Microbiol. Scand. 19, 165, 1942.  
*Thibault, P. & Rist, N.*: C. R. Soc. Biol. 133, 605, 1940.  
*Zikowsky, J.*: Wiener Klin. Wschr. 53, 859, 1940.

## UNTERSUCHUNGEN ÜBER CATGUT. II.

Bakteriologische Untersuchung einer Reihe  
gebräuchlicher Catgutpräparate.

Von *Henry M. Christensen* und *Poul V. Marcussen*.

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. Juni 1942).

In den Jahren, die auf *Lister's* umfassende Untersuchungen folgten, war die Catgutzubereitung eine Arbeit, welche in der Hand des Chirurgen lag; doch führten dann die steigenden Anforderungen, die an die Anwendbarkeit des Fadens als Nahtmaterial gestellt wurden, bald dahin, dass die Herstellung allmählich völlig an die Techniker überging. In unseren Tagen ist es daher oft der Fall, dass der Chirurg, der in allen anderen Punkten die Sterilität in seinem Operationsraum überwacht, in bezug auf das Nahtmaterial sich auf eine Garantie verlassen muss, zu deren Nachprüfung für ihn nur eine beschränkte Möglichkeit besteht.

Denkt man daran, dass die Sterilität des Catguts eine der meist diskutierten Fragen ist, so kann man sich auch nicht darüber wundern, dass bereits zu einem frühen Zeitpunkte warnende Stimmen sowohl von Seiten der Bakteriologen als auch der Chirurgen laut wurden (*Lauenstein, Schaeffer, Halban & Hlawacek, Jacobi* u. a.). In den Jahren 1900—1925 ist die Frage ständig diskutiert worden, hat jedoch aber nur eine geringe Aufmerksamkeit erweckt, obschon z. B. *Goris* 1916 eine bakteriologische Kontrolle allen Catguts verlangte. Parallel mit der Entwicklung der anaeroben Technik hat indessen die Catgutfrage erhöhtes Interesse bekommen. 1929 fand

*Bulloch* Mikroben in 77 % des bei 8 englischen und amerikanischen Firmen gekauften Catguts. Bei 5 Catgutmarken war durchschnittlich nur 1 von 10 Proben steril, und von einer Firma waren alle 63 untersuchten Proben unsteril. 1930 teilte *Knorr* mit, dass 80 % der 1400 m Catgut, die er im Laufe von 4 Jahren kontrolluntersucht hatte, infiziert waren. *Melleney & Chatfield* fanden bei einer entsprechenden Untersuchung 1931, dass das Catgut von 10 Firmen steril war, während dagegen dasjenige von 7 Firmen infiziert war, und zwar in einem variierenden Grade von 5 bis zu 67 %. *Konrich & Zeissler* stellten 1933 80,7 % unsteriles Catgut fest. *Clock* berichtete in mehreren Arbeiten 1933–35 über entsprechende Verhältnisse, da 46,5 % des von ihm untersuchten Catguts (174 Proben, die aus 12 chirurgischen Abteilungen stammten) sich als unsteril erwiesen. Der Sterilitätsgrad war für Catgut von verschiedenen Firmen und aus verschiedenen Ländern sehr verschieden. So ergibt sich aus *Clock's* Arbeit von 1934, dass englisches Catgut zu 29,5 %, deutsches zu 85,7 %, französisches zu 13,3 %, japanisches zu 100 % und spanisches zu 63 % unsteril war. Zuletzt hat *Brewer* über die Verhältnisse in Amerika berichtet, wo er eine Abnahme in der Zahl der unsterilen Fabrikpräparate (auf 12,5 %) konstatieren konnte, indem nur neuhergestelltes Material mitgerechnet wurde. Diese Abnahme beruhte anscheinend auf dem Übergang zur Wärmesterilisation, wie sie in *Melleney & Chatfield* und *Clock's* Arbeiten empfohlen worden war.

Veranlasst dadurch, dass »Novo terapeutisk Laboratorium« 1939 die Fabrikation von Catgut zu chirurgischen Zwecken begann, gab Professor Oluf Thomsen uns die Anregung zur Aufnahme ähnlicher Untersuchungen mit Hilfe einer allen Anforderungen genügenden bakteriologischen Technik, und eine vorläufige Mitteilung (*O. Thomsen*) rief eine Diskussion in der dänischen medizinischen Presse hervor (*Wulff, Thomsen, Claudius*). Wir haben seitdem nach Vervollkommenung der Technik unsere Untersuchungen weiter ergänzt und wollen in der vorliegenden Mitteilung Bericht ablegen über: 1) die Methodik der Sterilitätsprüfung, 2) das Ergebnis einiger Untersuchungen von Catgutpräparaten, die in dänischen Krankenhäusern gewöhnlich zur Anwendung kommen.

### *Die Sterilitätsprüfung:*

Die Bakterienflora im Catgut stammt teils aus dem Rohmaterial, den Schafdärmen, teils von Zufuhr im Verlaufe der technischen Zubereitung. Sie kommt sowohl auf der Oberfläche des Fadens wie auch in dessen Innerem vor. Will man sich einen Begriff

davon bilden, eine wie grosse Effektivität die Sterilitätsprüfung haben muss, so ist es von Wichtigkeit, sich eingehender mit der Frage zu beschäftigen, welche Flora man in einem unvollständig sterilisierten Catgut erwarten kann. Zweifel scheint 1879 als erster Mikroorganismen beobachtet zu haben; seitdem liegt eine umfangreiche Literatur vor, deren Ergebnisse im grossen und ganzen übereinstimmend sind. Brunner wies 1890 einen »Catgutbazillus« nach, der nach seiner Beschreibung dem von Globig 1888 beschriebenen *Bc. globigii* oder *Bc. mesentericus ruber* entspricht; derselbe ist später auch von zahlreichen anderen Untersuchern aufgefunden worden (Braatz 1891, Binney 1904, Johnson 1905, Lenz & Lockemann 1909 ausser vielen späteren Arbeiten). Ausserdem wurden eine Reihe anderer Bazillen nachgewiesen, so von Lauenstein 1895 *Micrococcus tetragenus* und *Bc. subtilis*, von Minervini 1899 *Proteus* und Kokken, von Binney 1904 *Subtilis* und ein nichtidentifiziertes Stäbchen. Die letzten Jahre haben mit der Entwicklung der anaeroben Züchtung besonders lehrreiche Wahrnehmungen mit sich gebracht; so wies z. B. Knorr neben dem *Bc. mesentericus ruber* zahlreiche zum Teil maligne Anaerobier nach (vgl. auch Melleney & Chatfield), und ein besonders interessantes Bild der Mannigfaltigkeit der Bakterienflora wurde von Clock gegeben. Detaillierte Aufschlüsse über die Bakterienfunde haben indessen ein geringeres Interesse für den Chirurgen, insbesondere da die Identifizierung der nachgewiesenen Bazillen sehr schwierig sein kann (vgl. u. a. Oesterle); die Untersuchung muss daher besonders darauf gerichtet sein, zu entscheiden, ob die Flora des Fadens von Luftinfektion herrühren kann oder ob die Bazillen aus dem Darm stammen, was also gleichbedeutend mit einer unvollständigen Sterilisation ist. Wenn Darmflora nachgewiesen ist, z. B. *mesentericus ruber*, besteht keine Garantie dafür, dass die Fäden nicht maligne, sporenbildende Bazillen enthalten, selbst wenn kein direkter Nachweis derselben gelingt (vgl. Knorr). Wird nur eine Flora aufgefunden, die von Luftinfektion stammen kann, so wird dieselbe wohl in der Regel weniger ernst zu nehmen sein, es aber doch unmöglich machen, die Anwesenheit von z. B. pyogenen Kokken auszuschliessen. Der wichtigste Punkt bei den Untersuchungen ist deshalb die Effektivität der Sterilitätsprüfung, in zweiter Reihe kommt dann eine orientierende Untersuchung der nachgewiesenen Flora.

Die Prinzipien für eine effektive Catgut-Sterilitätsprüfung sind in Wirklichkeit älteren Datums. Bereits Geppert (1889) wies nach, dass die zur Präparation verwendeten Chemikalien vor der Aussaat von den Fäden entfernt werden müssen, da sie sonst bakteriostatisch wirken würden, sowie dass diese Entfernung mit Hilfe einer chemischen Neutralisierung vorgenommen werden kann. Eine An-

zahl Untersucher haben freilich im Laufe der Zeit diese Methode vernachlässigt (z. B. *Watson* 1916 und *Fraenkel* 1926); doch ist sie in allen neueren Arbeiten zur Anwendung gekommen (*Melleney & Chatfield*, *Clock*, *Bullock* u. a.). So kann Jod mit 1 %—10 % Natriumthiosulfat und 1 % Natriumkarbonat entfernt werden, Formalin durch eine lange Behandlung mit Ammoniakwasser und Alkohole mit Wasser. Chrom und Quecksilber sind sehr schwer zu entfernen, weshalb eine Sterilitätsprüfung von Material, in dem diese Stoffe nachgewiesen sind, mit Vorbehalt zu betrachten ist.

Von derselben Bedeutung wie die Neutralisation ist die Anwendung eines guten Nährbodens. In den letzten Jahren ist von der Mehrzahl der Untersucher *Novy's Medium* benutzt worden, evtl. unter Zusatz von Agar oder Serum. Der Nährboden muss dauernd mit einem nur sehr schlecht wachsenden *Bazillus* kontrolliert werden.

Eine besondere Bedeutung für die anaerobe Züchtung hat die Einführung des *Zeissler'schen* Vakuumbehälters gehabt (*Lange* 1927), da die Züchtung der luftbildenden Bakterien hierdurch weit einfacher wird und die Züchtungszeit eine ausreichende Länge erhalten kann.

Von anderen Prinzipien, die in wechselndem Grade angewandt worden sind, seien noch genannt Vorbeuge gegen Luftinfektion sowie effektive Sterilisierung aller Instrumente, Behälter und Flüssigkeiten, die in Berührung mit dem Faden kommen. Sehr wichtig ist die Grösse der zur Aussaat verwendeten Fadenmenge. Einige Untersucher haben wenige cm gebraucht, andere dagegen Längen, die chirurgischen Nähten entsprechen. Die Bedeutung der Benutzung grosser Mengen ergibt sich deutlich aus *Mackie's* Untersuchung 1928. *Mackie* untersuchte aus Anlass von postoperativen Tetanusfällen ein grosses Catgutmaterial. Bei einer der geprüften Catgutpartien untersuchte er 12 Proben von beträchtlicher Grösse. Nur aus einer Probe gelang es *Clostridium tetani* zu isolieren. Bei Wiederholung der Untersuchungen derselben Catgutpartie nach einem Monat gelang es überhaupt nicht, Tetanusbazillen zu isolieren.

### *Eigene Untersuchungen. I.*

#### *Die Methodik der Sterilitätsprüfung.*

Alle Prozesse, die der Faden vom Auspacken bis zu seiner Anbringung in dem Glas mit dem Nährsubstrat durchzugehen hatte, wurden in einem nach *Walbum & Reymann's* Angaben speziell für diesen Zweck eingerichteten, staubfreien Raum vorgenommen.



Derselbe ist als ein Operationszimmer mit ölgemalten Wänden und Terrazzofussboden mit runden Ecken, der sich mit einem Schlauch spülen lässt, eingerichtet. Tür und Fenster sind in geschlossene Zustände luftdicht.

Die Luft kommt in den Raum durch einen Lufteinsaugungskanal. Zuerst passiert sie durch einen Ölfilter und dann dort, wo der Kanal in das Zimmer einmündet, durch einen Wattefilter mit siebenfacher Lage hydrophober Watte, welche ab und zu erneuert wird.

Die Reinhaltung des Raumes wird nach *Walbum & Reymann's* Methode vorgenommen.

Die Luftsterilisation im Zimmer geht mit Hilfe eines Junkers Rohrs vor sich, das vor jedem Versuch 3—4 Stunden in Funktion ist.

Die Feuchtigkeit wird mit ausströmendem Wasserdampf aus der Heizungsanlage reguliert.

Der Keimgehalt der Luft wird kontrolliert, indem man von Zeit zu Zeit während der Versuche an verschiedenen Stellen des Raumes Blut- und Malzagarschalen anbringt. Wir haben in keinem Falle die gleiche Flora auf den Kontrollplatten und in den Kulturgläsern vorgefunden.

Die angewandte Apparatur wurde nach praktischer Erfahrung gewählt.

Zur Neutralisation der in dem Material nachgewiesenen chemischen Stoffe und zur Auswässerung wurden grosse Präparatgläser  $5 \times 20$  cm angewandt, die mit einem hydrophoben Wattepfropfen und überhängendem Glasdeckel verschlossen sind. Zur Züchtung wurden grosse Pyrex-Reagenzgläser  $3 \times 15$  cm benutzt, welche mit einem gazeumwickelten Wattepfropfen verschlossen und mit einer doppelten Lage Papier überbunden waren.

Die Überführung des Materials wurde mit langen Pinzetten und starken Zangen vorgenommen, welche zugleich auch zum Festhalten des Knäuels bei seiner mit langen, kräftigen Scheren vorgenommenen Aufteilung benutzt wurden.

Glasapparatur und Instrumente wurden 3 Stunden im Trockensterilisator bei  $155^{\circ}$  sterilisiert.

In einer Reihe orientierender Versuche wurden folgende Nährsubstrate durchgeprüft:

Novy's Nährboden

Halbflüssiger Agar (0,5 %)

Halbflüssiger Agar — 1 % Glukose

Halbflüssiger Agar — 5 % Serum

Halbflüssiger Agar — 5 % Pferdeblut

Die Durchprüfung wurde mit Laboratoriumsstämmen von *Clostridium tetani* und *Clostridium oedematis maligni* vorgenommen. Die Nährböden wurden mit steigenden Verdünnungen einer 24stündigen Bouillonkultur dieser Stämme beimpft. Es zeigte sich Wachstum in den Substraten bis zu einer Verdünnung von zwischen 1/10 Million und 1/20 Million.

Zum Teil wurden Probeaussaaten von dem Rohmateriale (getrocknetem und gesalzenem Schafdarm) sowie von »vorsterilisiertem« Catgut vorgenommen. Hierbei kam es zu Wachstum von Bakterien, die der bei der Catgutzüchtung selbst gefundenen Flora entsprachen.

Die orientierenden Catgutkulturen zeigten, dass die drei erstgenannten Substrate ausreichend für die Versuche waren, weshalb alle späteren Aussaaten in denselben vorgenommen wurden.

Die Substrate wurden nach hier im Institut angewandten Standardmethoden hergestellt und ausschliesslich durch 15 Minuten Sterilisation im Wasserdampf bei 100° an 3 aufeinander folgenden Tagen sterilisiert. Das Abfüllen in die trockensterilisierten Kulturgläser wurde unmittelbar vor der dritten Dampfsterilisation vorgenommen. Nach beendeter Sterilisation wurden die Nährböden nach dreitägigem Stehenlassen bei 37° im Thermostaten kontrolliert. Schliesslich wurde unmittelbar vor dem Beimpfen eine erneute Dampfsterilisation für 5 Minuten mit nachfolgender schneller Abkühlung vorgenommen.

Die angewandten Neutralisationsflüssigkeiten und das Wasser wurden durch ¾stündiges Autoklavieren in konischen Kolben bei 2 Atmosphären Druck sterilisiert und gründlich

auf ihre Sterilität kontrolliert. Beim Alkohol wurde die Sterilisation jedoch durch Seitzfiltrierung vorgenommen.\*)

Das Auspacken des Materials geschah mit grosser Vorsicht, und der Knäuel wurde mit einer sterilen Pinzette schnell in die Neutralisationsflüssigkeit übertragen. Die Art und Stärke derselben variierte mit dem Gehalt des Fadens an Chemikalien. Das Neutralisationsglas wurde danach für einen Tag in den Thermostaten bei 37° gestellt. Bei gewissen Untersuchungen, bei denen man es für nötig ansah, wurde der Neutralisationsprozess in einem neuen Glas fortgesetzt.

Danach wurde das Material in einem Glas mit sterilem Wasser mindestens einen Tag lang ausgewässert.

Nach beendeter Neutralisation und Auswässerung wurde der Knäuel aufgeteilt — indem der ganze Knäuel mit Pinzetten oder Zangen festgehalten und mit langen Scheren durchgeschnitten wurde — und auf 8 Kulturgläser verteilt.

Wenn mehrere Knäuel zu gleicher Zeit behandelt wurden, waren die Instrumente zu Beginn trockensterilisiert und wurden danach vor jeder Manipulation sehr sorgfältig in der Gasflamme flambiert.

Die Hälfte der Kulturgläser wurde bei 37° unter aeroben Bedingungen in einem besonderen Thermostaten angebracht, welcher nur zu den gleichen Versuchen verwendet wird.

Die restlichen Gläser wurden in verschiedener Weise zu anaerober Züchtung benutzt.

Im Beginn kam eine von einigen Untersuchern empfohlene Methode zur Anwendung: Züchtung unter einem sterilen Paraffinpfropfen. Das Paraffin wurde — unmittelbar nach der Beimpfung — in geschmolzenem Zustande direkt oben auf das Nährsubstrat in einer ca. 5 cm hohen Schicht zugefüllt.

Die Zufüllung des Paraffins ging mit Hilfe eines besonders konstruierten Apparats vor sich, und das Erstarren des »Pfropfens« kam zustande, sobald das Paraffin die kalte Oberfläche des Nährbodens erreichte.

Die Technik bereitete keine Schwierigkeiten, doch entstanden solche, sobald es zu Wachstum von luftbildenden

---

\*) Später haben wir uns doch von autoclawiertem Alkohol benutzt.

Bakterien kam. In diesen Fällen wurde der Paraffinpfpfropfen von der entwickelten Luft oben aus dem Glase herausgepresst. Aus diesem Grunde kassierten wir die Methode und wandten bei unseren späteren Versuchen ausschliesslich Züchtung in Zeisslerbehältern an. Die Behälter waren mit einer Ölpumpe (Leybold) bis zum Vakuum ausgepumpt worden, in welchem dann die Züchtung vorgenommen wurde.

Zur Orientierung wurden auch Kulturen in Stickstoffatmosphäre und 15 mm Kohlendioxydatmosphäre vorgenommen; da jedoch diese Vorgangsweisen keine Vorzüge aufwiesen, wurden die eigentlichen Versuche alle mit Züchtung im Vakuum angestellt.

Die Züchtungen erstreckten sich über einen Zeitraum von niemals weniger als 3 Wochen. Wir haben ebenso frühere Untersucher oft beobachtet, dass Wachstum erst so spät wie am 8.—14. Tage eintrat. Ausserdem zeigten unsere Versuche, dass man von einem aufgeteilten Knäuel, von dem beträchtliche Mengen in jedem Kulturglas angebracht werden, sehr gut Wachstum nur in einigen Gläsern bekommen kann, während sich andere als steril erweisen (s. die oben erwähnten Untersuchungen von *Mackie*).

In den Fällen, wo die Kultur Wachstum ergab, wurde Reinzüchtung der gewachsenen Bakterienarten vorgenommen und dieselben dann auf ihre Morphologie, ihr Wachstumsverhalten und ihre Vergärungsfähigkeit untersucht.

Es ist bei diesen Untersuchungen bisher nur gelungen, einzelne der isolierten Stämme zu identifizieren, nämlich verschiedene Kokken, *Pseudotetanus*bazillen, *Bacillus mesentericus ruber* und Bakterien der *Subtilis*gruppe.

### *Eigene Untersuchungen. II.*

#### *Untersuchung von Catgutpräparaten mit Sterilitätsgarantie.*

Mit der oben beschriebenen Methode haben wir Catgutpackungen von 9 verschiedenen Fabrikpräparaten untersucht, welche alle mit Garantie für Sterilität verkauft und an chirurgischen Krankenhausabteilungen in Dänemark verwendet werden.

Die Präparate wurden von uns selbst bei autorisierten Händlern eingekauft, in einzelnen Fällen wurden sie uns zur Untersuchung im Rahmen mehr umfassender Untersuchungen über die Sterilität in Operationsräumen überlassen. Die quantitativen Resultate sind in der *Tabelle I* wiedergegeben, in

*Tabelle I.*

Die Tabelle zeigt die infizierte Catgutmenge bei 9 Fabrikpräparaten.

Fabrikat	Untersuchte Fadenstärken	Untersuchte Menge Packungen	davon infiz. Packungen	%	Untersuchte Menge Meter	davon infiz. Meter	%
I	0—1—2	5	5	100	250	250	100
II	0—1—2—3—4	9	6	67	280	225	80
III	0	2	1	50	100	50	50
IV	0	3	3	100	150	150	100
V	2	1	0	0	50	0	0
VI	0	10	10	100	5	5	100
VII	0	2	1	50	10	5	50
VIII	00—0	3	0	0	105	0	0
IX	0—1—2	3	0	0	150	0	0
		38	26	68,4	1100	685	62,3

der die Fabrikate mit römischen Ziffern bezeichnet sind. Aus der Tabelle geht hervor, dass ein Drittel der Präparate Wachstum von allen untersuchten Proben gab, ein Drittel gab Wachstum von einem beträchtlichen Prozentsatz der Proben, und in einem Drittel gelang es nicht, Mikroben nachzuweisen. 68 % der untersuchten Packungen gaben Wachstum, was 685 m (62 %) der insgesamt untersuchten 1100 m entspricht.

Die Beurteilung des Züchtungsergebnisses wurde summarisch vorgenommen, da wir auf keine sicher konstatierten klinischen Fälle von Catgutinfektion gestossen sind. In Tabelle II findet man eine schematische Angabe über den Grad

Tabelle II.

Die Tabelle zeigt die Verteilung der nachgewiesenen Bakterien (aerob-anaerob, Luftinfektion — Darminfektion).

Fabrikat	Anaerobes Wachstum	Aerobes Wachstum	Luftinfektion	Darmbakterien
I	+++	+++	+	+++
II	+++	+++		+++
III	++	++		++
IV	+++	+++		+
V				
VI	+++	+++		+
VII	+	+		+
VIII				
IX				

des aeroben und anaeroben Wachstums (Kolonne I). In Kolonne II haben wir als sicher nachgewiesene Darmflora (+++) Fälle bezeichnet, in denen *Bc. mesentericus ruber* oder *Bc. pseudotetani* isoliert worden sind; als zweifelhafte Darmflora (++) haben wir die Subtilisgruppe und nicht-identifizierte Sporenbildner bezeichnet und endlich mit + solche Fälle, in denen nur Bazillen der Subtilisgruppe nachgewiesen wurden. Als spätere Beimischung (Luftinfektion) haben wir Sarzinen und Staphylokokken bezeichnet. Pilze sind nur in einzelnen Fällen aufgefunden worden, zu einem sehr späten Zeitpunkt der Züchtung, und es gab immer ein entsprechendes Wachstum aussen auf den Wattepfropfen und in den Anaerobenbehältern.

Die Tabelle zeigt, dass in einem Drittel der Fälle eine sichere Darmflora nachgewiesen wurde, in einem Drittel alleine Subtilis und nur in einem einzigen Falle eine wahrscheinlich nach der Sterilisation eingetretene Beimischung.

## Diskussion.

Mit einer im wesentlichen auf älteren Erfahrungen aufgebauten, jedoch in der Weise modifizierten Züchtungsmethode, dass zu jeder Kultur ein grosses Quantum Catgut (5—10 m in jedem Glas) benutzt und gleichzeitig die Möglichkeit einer Luftinfektion auf ein Minimum reduziert wird, wurde Bakterienwachstum von 62 % der 1100 m Catgut nachgewiesen, die von 9 verschiedenen mit Garantie für Sterilität verkauften Fabrikpräparaten herrührten. 3 Präparate waren steril, während in 6 Präparaten konstant Bakterien nachgewiesen wurden. Vergleicht man dieses Ergebnis mit entsprechenden Untersuchungen der letzten 15 Jahre aus anderen Ländern (*Tabelle III*), so sieht man deutlich, dass die Catgutfrage noch existiert, und dass eine beträchtliche Anzahl chirurgischer Abteilungen mit unsterilem Faden arbeiten muss.

Aus der summarischen Bewertung der Bakterienfunde ergibt sich (*Tabelle II*), dass die bakterielle Beimischung nicht auf Infektion beim Einpacken oder Aufbewahren des Fadens zurückzuführen ist, was gut mit dem allgemeinen Eindruck übereinstimmt, den man von der Sorgfalt bekommt, mit welcher der Faden meistens verpackt ist, oft übrigens in unnötig komplizierten Packungen. Man muss vermuten, dass die Bakterienflora von dem Grundmateriale: dem Schafsdarm, herrührt, und dass die Schwierigkeiten der Herstellungs-

Tabelle III.

Untersucher	unsteriles Catgut
Bullock..... 1929	77%
Knorr..... 1930	80%
Melleney & Chatfield ..... 1931	12,5%
Konrich & Zeissler ..... 1933	80,7%
Clock..... 1935	46,5%
Brewer..... 1937	12,5%
Christensen & Marcussen . 1941	62,3%

methode daher in dem Sterilisierungsprozesse selbst liegen. Wenn derselbe nicht ausreicht, um sporenbildende Bakterien sicher zu töten, wird die Flora des Fadens von dem Darmmaterial bestimmt sein, das zur Catgutherstellung benutzt wird. In der vorliegenden Untersuchung wurden keine sicher pathogenen Bazillen nachgewiesen, noch freilich Sporenbildner, deren Resistenz im grossen und ganzen der Resistenz bei den anaeroben Wundbakterien entsprach. Es beruht daher sicherlich auf einer Zufälligkeit, ob die letzteren in Untersuchungen von beschränkten Catgutmengen nachgewiesen worden sind oder nicht, und es scheint berechtigt, darauf hinzuweisen, dass ein grosser Prozentsatz der als »steriles Catgut« verhandelten Präparate nicht nur unsteril ist, sondern auch keine Garantie dafür bieten kann, dass die Bakterienflora nicht hin und wieder pathogene, vom Ausgangsmaterial herrührende Wundbazillen umfassen kann.

### *Zusammenfassung.*

Bei Anwendung einer im einzelnen beschriebenen Technik, bei der ein besonderer Wert auf Benutzung grosser Mengen zu jeder Sterilitätsprüfung sowie auf Verhinderung von Luftinfektion gelegt worden ist, wurde Bakterienwachstum von 62 % von 1100 m mit Sterilitätsgarantie verkauftem Handelscatgut nachgewiesen. Die Proben stammten von 9 Firmen; die Packungen von 3 Firmen waren steril. In den Packungen von den 6 anderen Firmen wurden Darmbakterien oder *Bc. subtilis* aufgefunden. Nur eine einzige Probe liess auf spätere Beimischung schliessen.

### ZITIERTE VERÖFFENTLICHUNGEN.

- Binney, H.*: Boston Med. Surg., 150, 504, 1904.  
*Braatz, E.*: Beitr. klin. Chir., 7, 70, 1891.  
*Brewer, J. H.*: J. A. M. A. 108, 722, 1937.



- Brunner, C.*: Beitr. klin. Chir., 6, 98—194, 1890.
- Bullock, W.*: Brit. Med. Res. Council, London. Spec. Rep. Series 135  
Pat. I, 1929.
- Claudius, M.*: U. f. L., 101, 759, 1939.
- Clock, R. O.*: Surg. Gyn. and Obst. 56, 149, 1933.  
— Surg. Gyn. and Obst. 59, 899, 1934.  
— Surg. Gyn. and Obst. 60, 202, 1935.  
— Surg. Gyn. and Obst. 61, 789, 1935.  
— Surg. Gyn. and Obst., 66, 878, 1938.
- Fraenkel, L.*: Zbl. Chir., 53, 1048, 1926.
- Geppert, J.*: Berl. klin. Wschr., 26, 789, 819, 1889.
- Globig, Z.*: Hyg. Infekt. kr., 3, 322, 1888.
- Goris, A.*: Ann. Inst. Pasteur, 30, 707, 1916.
- Halban, J. & Hlawacek, R.*: Wien. klin. Wchschr., 9, 347, 1896.
- Jacobi, O.*: Abst. Zbl. Chir., 24, 495, 1897.
- Johnson, F. W.*: Boston Med. Surg. J., 152, 161, 1905.
- Knorr, M.*: I: Münch. med. Wchschr., 77, 514, 1930.  
— II: Münch. med. Wchschr., 77, 581, 1930.
- Konrich, F. & Zeissler*: Arch. f. klin. Chir., 177, 742, 1933.
- Lange, W.*: Deutsch. med. Wchschr., 36, 1503, 1927.
- Lauenstein, C.*: Arch. klin. Chir., 50, 323, 1895.
- Lentz & Lockemann*: Klin. Jahrb., 20, 566, 1909.
- Lister, J.*: Lancet, 1, 451, 1869.  
— Brit. Med. J., 1, 245, 1909.
- Mackie, T. J.*: Edinburgh. 1928. An inquiry into postoperative tetanus—  
a rep. to the scot. Board of Health.
- Melleney, F. L. & Chatfield, M.*: Surg. Gyn. and Obst., 52, 430, 1931.
- Oesterle, P.*: Zbl. f. Bakt. I, Abt., 143, 318, 1938—39.
- Schaeffer, R.*: Z. Geburtsh. Gynäk., 35, 164, 1896.
- Thomsen, O.*: U. f. L., 101, 641, 1939.  
— U. f. L., 101, 661, 1939.
- Walbum, L. E. & Reymann, Fr. E.*: Hospitalstidende, 80, 357, 1937.
- Watson, C. H.*: Surg. Gyn. and Obst., 23, 629, 1916.
- Wulff, H.*: U. f. L., 101, 661, 1939.
- Zweifel*: Zbl. Gynäk., 3, 295, 1879.

#### ANDERE BENUTZTE VERÖFFENTLICHUNGEN.

- Boggild, D.*: U. f. L., 99, 554, 1937.
- Claudius, M.*: København. 1906. Undersogelser over Jodcatgut.
- Dalrymple-Champneys, W.*: Proc. Royal Soc. of Med., 29, 465, 1936.
- Fürle, J.*: Arch. f. klin. Chir., 149, 277—301, 1922.  
— Zbl. f. Chir., 51, 478, 1924.

- Fuhrmann, L.*: Zbl. f. Chir., 59, 1098, 1932.  
*Goris, A. & Liot, A.*: Ann. Inst. Past., 48, 636, 1932.  
*Greife, H.*: Münch. med. Wchschr., 48, 1005, 1901.  
*Holm, E.*: U. f. L., 95, 609, 1933.  
 — U. f. L., 101, 275, 1939.  
*Hühne, T.*: Zbl. f. Chir., 3, 2866, 1931.  
*Kersting*: Deutsch. med. Wchschr., 55, 355, 1929.  
*Konrich, F.*: Arch. f. klin. Chir., 125, 275, 1923.  
 — Fortschr. d. Therap., 19, 399, 1933.  
*Kuhn, F.*: Zbl. f. Chir., 54, 2573, 1927.  
*Kuhn, P.*: Münch. med. Wchschr., 77, 1056, 1930.  
*Kuhn, Ph. & Dombrowsky, K. H.*: Münch. med. Wchschr., 79, 790, 1932.  
*v. Linden, G.*: Zbl. f. Chir., 59, 1506, 1932.  
 — Zbl. f. Gyn., 56, 2996, 1932.  
*Linhart, D.*: Münch. med. Wchschr., 82, 1711, 1935.  
*Mayr, A.*: Münch. med. Wchschr., 35, 2211, 1931.  
*Minervini, R.*: Deutsch. Z. Chir., 53, 1, 1899.  
*Melleney, F. L. & Chatfield, M.*: Surg. Gyn. and Obst., 50, 271, 1930.  
 Memorandum sur le catgut chirurgical sterilise. Bull. office internat d'hygiene 29, 348, 1937.  
*Piening, C.*: Zbl. f. Bact. I. Orig., 124, 216, 1932.  
*Porteous, E. R.*: Edinb. Med. Journ., 44, 245, 1934.  
*Propping, K.*: Zbl. f. Chir., 50, 1028, 1923—26.  
*Reil, H.*: Bruns Beitr. z. klin. Chir., 144, 433, 1928.  
*Singley, J. D.*: Ann. of Surg., 100, 559, 1934.  
*Spray, R. S.*: Journ. of Bact., 32, 135, 1936.

## HEREDITARY DIFFERENCES IN THE CAPACITY OF GUINEA-PIGS FOR THE PRODUCTION OF DIPHTHERIA ANTITOXIN

By *Inga Fjord Scheibel*.

(Received for publication June 26th 1942).

In 1932—34, at the initiative of the Committee of Hygiene of the League of Nations, several institutes in various countries carried out a number of comparative investigations on the antigenic effect of diphtheria anatoxin. The Danish State Serum Institute, Copenhagen, took part in these investigations, some of which were performed on guinea-pigs. Thus we had a good opportunity to ascertain the already realized fact that some guinea-pigs form no measurable amount of antitoxin, whereas others form abundant amounts. This observation led us to the idea that it might perhaps be practicable by selection and inbreeding to segregate an accidental population of guinea-pigs into an antitoxin-producing strain and a nonantitoxin-producing strain, and in this way to ascertain whether the differing reactivity of the two strains might be due to extraneous, more or less accidental factors or chiefly to hereditary factors.

The familial occurrence of diphtheria was realized already long ago. As early as 1877 and 1893 Jacobi (10) and Gottstein (6) called attention to it. After the introduction of the Schick test, Park, Zingher & Lerota (14), Bundesen (2), Graff & Ginsberg (7) and others reported that in their extensive application of the Schick test some families were found to present particularly many Schick-positive

individuals and others particularly many negative. In the Schick-test investigation comprising 116 families, Hirszfeld & Hirszfeld (8) found that when both parents are Schick-positive, nearly 100 % of the children are Schick-positive, too, and when one of the parents is positive and the other negative, about half of the children are positive, whereas only about one-third of the children are positive when both parents are negative. On the other hand, Rist & Weiss (16) found no constant conformity between the reactions of mothers and their children.

Naturally, no exact conclusions concerning hereditary aspects may be drawn from a material when no control is practicable with regard to such decisive factors as exposure and degree of infection. Indeed, the various authors are very cautious in this respect, advancing merely the hypothesis that the capacity for antitoxin production probably is hereditary and dependent on a dominant Mendelian gene (Hirszfeld & Hirszfeld (8, 9)).

From examinations with the Schick test in Copenhagen and from statistical treatment of the results reported by previous investigators, Rosling (17) arrived at the conclusion that the capacity for antitoxin production probably depends on a single Mendelian factor of incomplete dominance.

In studies on twins, various investigators found the discordance percentage for the morbidity in diphtheria to be about the same for uniovular and biovular twins, being respectively 44—51 % and 56—62 % (*c. g.*, Weitz (25, 26), Gebbing (5), v. Verschuer (24)). This is not indicative of any hereditary factor, but it has to be kept in mind that the given percentages merely represent a count of cases irrespective of natural antitoxin, milieu and other contributory circumstances.

In his studies on twins, reported in 1937, Bühler (3) has investigated this question somewhat more systematically, measuring the antitoxin titer in 24 pairs of uniovular twins and 15 pairs of biovular twins before and after active immunization with two injections of a diphtheria vaccine. His results showed an equally great discordance between the titers observed in the uniovular twins and in the biovular — before as well as after the vaccination. From these findings he arrived at the conclusion that the capacity for antitoxin production cannot be of hereditary nature. He fails to give any information, however, as to the diphtheritic history of the individual twins or their infectious aspects. A possible divergence in these respects might conceivably be the cause of the discordances observed, not only in natural immunity but also in the maximum titers, as it is well known that sensitized individuals react on a

vaccination with a stronger antibody formation than do non-sensitized subjects.

Besides, it seems to me that the maximum titer is too susceptible to surrounding factors to be suitable as a criterion in genetic investigation, and that the difference in titer is rather to be regarded as a modification of the same genotype according to the external conditions. This view finds support in the following quotation from Kühn's lectures on inheritance (12): »Die Erbanlagen bestimmen nicht die Ausbildung von Merkmalen schlechthin, sondern die Reaktionsnorm, die Art, wie die Zellen auf bestimmte Entwicklungsreize antworten. Aus Keimen mit gleichem Genotypus können sich sehr verschiedene Individuen als Modifikation ausbilden, jenach den Aussenbedingungen, unter denen sie sich entwickeln.«

Only a few experimental investigations on animals have been reported. In 1905, on titration of diphtheria toxin, Theobald Smith (21) noticed that the great differences in the resistance of the guinea-pigs varied more from one strain to another than from one individual to another of the same strain. A few breeding experiments corroborated his assumption that the resistance was of hereditary nature, but from subsequent experiments (22) he became convinced that the increased resistance in the offspring of resistant animals is due to passive immunity transmitted from the mother to the offspring, as only mothers that were treated preliminarily with toxin-antitoxin mixtures (rather strong active immunization) had more resistant offspring, whereas this could not be demonstrated with certainty in the offspring of animals that were treated preliminarily with toxin alone (slight active immunization) or with serum alone (passive immunization). The author thinks, however, that the reaction of the mothers is a »family property«. He thus considers the capacity for antitoxin production to be of genetic nature but he has not been able to demonstrate this for the reaction of untreated animals on injection of toxin (resistance).

The next experiments, as far as I have been able to find out, were not carried out till 1937 when Prigge (15) reported his findings on immunization of guinea-pigs from 5 different strains with varying doses of diphtheria anatoxin. One batch of animals were picked out from a genetically inhomogeneous animal material, whereas 4 batches were selected from four strains that had been inbred by brother-sister pairing through many generations. Prigge found that it required a considerably smaller amount of antigen to immunize 50 % of the animals from one inbred strain and from the genetically inhomogenous material against a certain amount of toxin than was required for the animals from the remaining three strains, and that two of the inbred strains did not show the extreme variations

observed in the other three batches of animals. These two inbred strains showed a very slight range of variation, whereas the inhomogenous strain and the remaining two inbred strains presented about the same, far greater, range of variations. On the basis of the results observed, Prigge emphasized the importance of working with a genetically well-known animal material, but he did not venture to draw any genetic conclusions from his findings. As to such conclusions, reference is made to a subsequent work by Professor Kröning — but this work has not been published yet.

As illustrated by this brief review of the literature, the various investigators differ a good deal in their view of the problem.

Opinions are more in harmony with regard to the question about the resistance to bacterial infection. In this field a great number of genetic investigations have been reported, the authors of which have been fairly consonant in concluding that increased as well as lowered resistance appear to be hereditary properties. These studies on resistance fall somewhat outside the scope of the present work, however, and I shall therefore refrain from reviewing them here and merely refer to the excellent review of this question given by Bradford Hill (1).

### *Experimental.*

The work here presented was aimed entirely at the capacity for antitoxin production, not at possible differences in resistance. The studies were carried out as follows:

From a number of immunizing experiments with diphtheria anatoxin on guinea-pigs that had been carried out for other purposes, a selection was made of males and females which had formed abundant amounts of antitoxin, and another group of males and females which had shown no measurable antitoxin formation in response to the same dose of antigen or, in some instances, even a greater dose. The population from which these animals were selected was of unknown genetic composition, the animals originating from four or five breeding centers. The animals were paired after this plan:

animals with a measurable antitoxin content of the blood were paired together, and animals without measurable antitoxin were restricted to their kind. This made altogether 10 pairs of the first kind, 5 of the second. These pairs constituted »P<sub>1</sub> good« and »P<sub>1</sub> poor« respectively for the good and the poor antitoxin-producing strains.

Gradually, as the pairs had offspring, the young were removed from the mother and separated in males and females. When the young had reached a weight of about 250 g. — which corresponded on an average to the age of 2—3 months — they were immunized by a single subcutaneous injection of 1 cc. of raw diphtheria anatoxin, prepared from Martin broth. The same anatoxin which contained 10 Fl. U. per cc., was used throughout the experiment. Four weeks later, a sample of blood was taken from each animal by heart puncture, and its antitoxin content was measured by intracutaneous titration on rabbits after Claus Jensen's method (11). From the offspring (»F<sub>1</sub> good«) of P<sub>1</sub> good a selection was made of the 10 males and 10 females that showed the highest antitoxin titer; and they were paired together, making P<sub>2</sub> good. From the offspring (»F<sub>1</sub> poor«) of P<sub>1</sub> poor, a selection was likewise made of 10 males and 10 females but without any measurable amount of antitoxin in the blood (i. e.,  $\leq 1/1000$  A. U. per cc.) and they were paired together, making 10 pairs of P<sub>2</sub> poor.

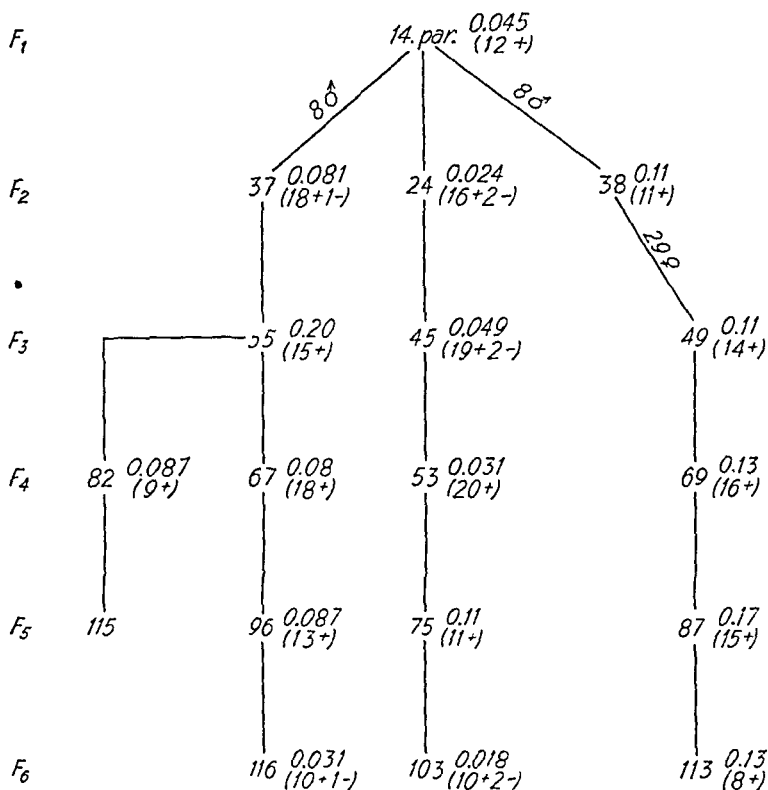
This regimen was continued through six generations of the good strain and five generations of the poor strain. As far as possible the inbreeding has been carried out exclusively with sibs. Only in a few instances where this was impracticable, animals from a corresponding family of the same generation were used for the pairing. An account for the last generation of both strains showed that no difference could be ascertained in the results for the pure brother-sister lines and for the lines with crossings. In the following, therefore, the material will be worked up as being uniform in this respect.

In the good strain, 6 of the original 10 families could be

carried through to the 6th generation (1 family was stopped at the 3rd generation, 3 families at the 2nd generation). In the poor strain the original 5 families were all carried through to the 5th generation. Each pair of parent animals has been kept in experiment for 2 years, unless this was

Diagram 1.\*)

Generation



\*) Explanation of the Pedigrees in Diagrams 1 and 2.

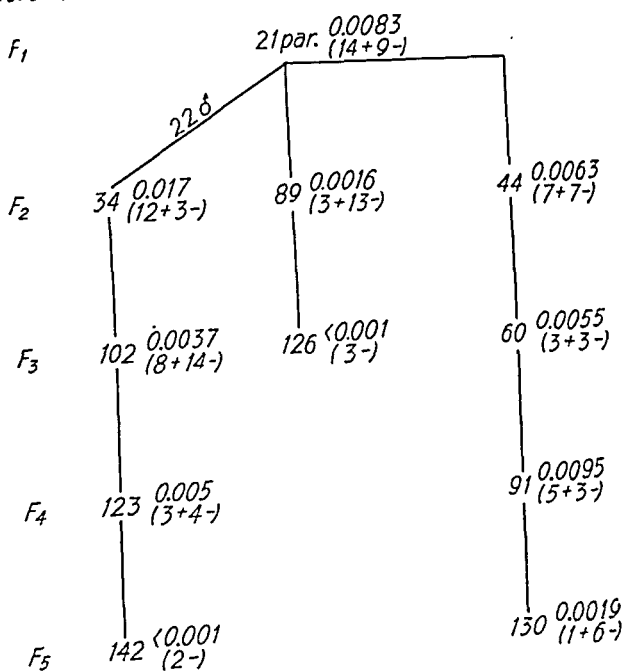
The figures between the lines give the number of the parental pair. The perpendicular lines mean that the inbreeding has taken place by pairing of sibs, while oblique lines signify pairing with offspring of a corresponding family of the same generation. The figure and sign affixed to oblique lines show from which pair the animal originated and its sex.



interrupted by intercurrent death; and in this period each pair has on an average had altogether 12 young in 5 litters. By keeping the P animals in experiment for such a long period it has been possible to obtain a fairly equal distribution of young over all the months of the year, as it was hoped that by this regimen it might be possible to counterbalance the

Diagram 2.

Generation



The figures in parentheses give the total number of young of the respective pairs. + affixed to these figures gives the number of young that have produced antitoxin, while — gives the number of young without any measurable amount of antitoxin in their blood ( $\leq 1/1000$  A. U. per cc.).

The figures over the parentheses give the geometrical average titer (A. U. per cc. of serum) for the offspring of each pair.

seasonal variations in the antibody production. (This question will be dealt with more thoroughly below). In this way, furthermore, it has also been possible to ascertain whether there was any consistency in the reaction of the various litters within the same family, and to carry through parallel lines within most of the families and thus ascertain whether the mode of reaction observed was characteristic of the family concerned.

The families within the two strains showed a pronounced agreement, so that it will suffice here to present the pedigrees of one family from each strain to illustrate the course of their inbreeding.

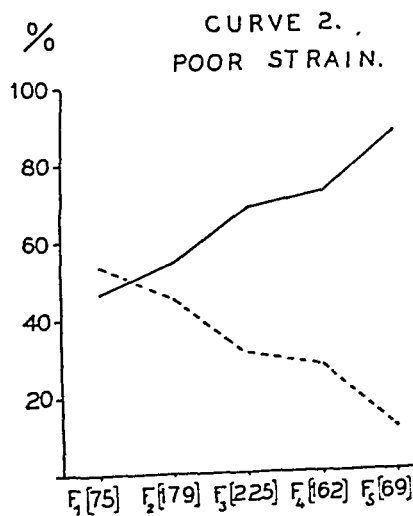
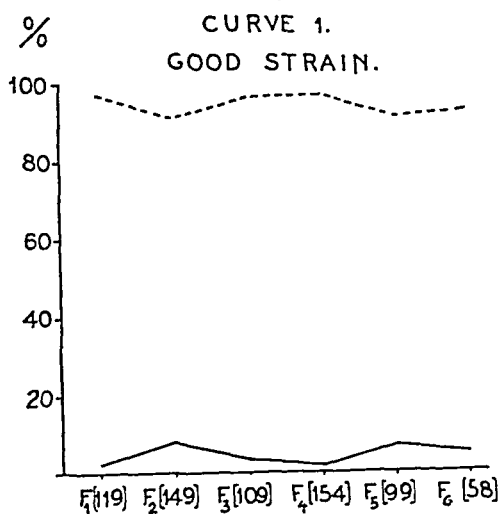
Diagram 1 shows that in all the lines descending from the 14th pair only a few non-producers were born and that they were encountered yet in the 6th generation. The antitoxin titers vary somewhat from one generation to another and from one line to another, though without deviating in any marked degree.

In comparison to Diagram 1, the strain in Diagram 2 shows numerous non-producers and, consequently, lower antitoxin titers. Here, too, the various lines show good agreement in this respect.

Curves 1 and 2 show the percental distribution of antitoxin producers (+) and non-antitoxin producers (—) among the total outcome in each generation and the total number of young in each generation (the figures in parenthesis along the axis of abscissas for the good strain and the poor, respectively). In the accidental population from which the  $P_1$  animals were picked out, the distribution after immunization and antitoxin titration was 56 % antitoxin producers and 44 % non-producers in a total of 150 guinea-pigs. As seen in Fig. 1, the inbreeding of the antitoxin producers has altered this percentage even in  $F_1$  to 97.5 % producers and 2.5 % non-producers. In spite of continued pairing between the best antitoxin producers, no additional decrease in the percentage of non-producers was obtained, the percentage remaining at about the same level through the following five generations.

---- =  $> 0.001$  A.U. per cc. (PRODUCER, +)

— =  $< 0.001$  A.U. per cc. (NON-PRODUCER, -)



Curve 2 shows that the pairing between the poor antitoxin producers has not resulted in any increase in their number in  $F_1$ , the distribution being here 53.4 % producers and 46.6 % non-producers.  $F_2$  shows a slight preponderance of non-producers (54.8 %), and the continued selection causes a steady increase in the number of non-producers, giving 88.5 % non-producers and 11.5 % producers in  $F_5$ .

So, in the course of the relatively few generations here concerned the original population has been segregated distinctly into a good antitoxin-producing strain and a poor one.

### *Height of Titer.*

To get an idea about the effect of the inbreeding upon the height of the titer, the average titer ( $\bar{x}$ ) is calculated for the total number of young in each generation after the formula

$$\bar{x} = \frac{x_1 + \dots + x_n}{n},$$

in which  $x$  is the logarithm of the measured antitoxin titer, and  $n$  is the number of observations, animals without measurable antitoxin being reckoned as having 1/1000 A. U. per cc. The antilogarithm of  $\bar{x}$  is given in Table 1.

*Table 1.*  
*Antitoxin Content of the Serum in All the Young.*  
Geometrical Mean.  
A. U. per cc. of serum.

Good strain	$F_1$ 0.036	$F_2$ 0.043	$F_3$ 0.079	$F_4$ 0.071	$F_5$ 0.068	$F_6$ 0.042
Poor strain	$F_1$ 0.0058	$F_2$ 0.0047	$F_3$ 0.0029	$F_4$ 0.0030	$F_5$ 0.0015	

In every generation the titers of the poor strain have been so much lower than those of the good strain that it is safe of exclude the possibility that the differences might be due to accidental factors. The matter stands differently, however,

in comparison of the various generations within the same strain. Here it is necessary to submit the material to a calculation of the standard deviation before any definite conclusions can be drawn; and before this can be done it has to be ascertained whether the antitoxin titers or a function of them follow the law of normal distribution. As the logarithms of the titers in such studies are found to come essentially nearer normal distribution than the titers themselves, the calculations have been carried out with the logarithms of the titers. Probit curves for each generation are calculated by employment of Table 9 in Fisher & Yate's »Statistical Tables« (4). They all showed a markedly curved form, which means that the distribution was not normal, and that the ordinary calculations of the standard deviation hence would serve no purpose.

As only the antitoxin producers are interesting in this connection, however, the probit curves were examined for these producers, with omission of all animals showing an antitoxin content  $\leq 1/1000$  A. U. per cc. of serum. These curves were found to be straight lines, so that it was safe to reckon that the logarithms of the titers found in these animals were distributed normally. Then the mean of these logarithms was calculated as described above. The anti-logarithms are given in Table 2.

Table 2.

*Antitoxin Content of the Serum in the Young with  $> 0.001$  A. U. per cc. Geometrical Mean.*

A. U. per cc. of serum.

	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>
Good strain	0.040	0.057	0.093	0.076	0.093	0.050
Poor strain	0.026	0.032	0.028	0.020	0.020	

After this, the standard deviations were calculated after the following principles:

For a single series of observations (generation) the variance ( $s^2$ ) was calculated after the formula

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1},$$

in which  $x_i$ ,  $-\bar{x}$  are the deviations of the logarithms of the titers from the mean and  $n$  the number of animals.

The variance gave the following values for the individual generations in the two strains:

<i>Good strain</i>	<i>Poor strain</i>
F <sub>1</sub> 0.2081	0.3198
F <sub>2</sub> 0.2489	0.2457
F <sub>3</sub> 0.2406	0.2420
F <sub>4</sub> 0.2183	0.2146
F <sub>5</sub> 0.2820	0.2457
F <sub>6</sub> 0.2791	

Thus the variance has not undergone any change in the course of the generations. It was safe, therefore, to reckon with a mean value which was 0.2347 for the good strain, 0.2518 for the poor strain.

This observation is in conflict with the view of Prigge (15) who thinks that inbreeding lowers the standard deviation.

In the cited paper, nothing is said about the standard deviation in the preceding generations or about the number of these generations. In a private communication, however, Prigge states that the two strains which showed the least standard deviations were inbred through most generations and that the number of generations was considerably higher than the 6 we are dealing with in the present studies. Perhaps this explains the divergence, as it is possible, indeed, that a change in the standard deviation would manifest itself only after inbreeding for considerably more generations than observed here.

The mean error of the difference ( $ME \{D\}$ ) was then calculated after the formula

$$ME \{D\} = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}},$$

in which  $n_1$  and  $n_2$  are the number of animals in the two series that are to be compared. Whether the difference,  $D$ , between two mean titers is significant is then tested by »Students  $t$ « (4, Table 3):

$$t = \frac{D}{ME \{D\}}$$

for which the following values were found:

<i>Good strain</i>	<i>Poor strain</i>	<i>Good strain contra poor strain</i>
<i>t</i>	<i>t</i>	<i>t</i>
$F_1-F_2 + 2.43$	$F_1-F_2 + 0.84$	$F_1-F_1 + 1.45$
$F_2-F_3 + 3.50$	$F_2-F_3 - 0.31$	$F_2-F_2 + 2.90$
$F_3-F_4 - 0.65$	$F_3-F_4 - 1.09$	$F_3-F_3 + 6.11$
$F_4-F_5 + 0.15$	$F_4-F_5 - 0.00$	$F_4-F_4 + 6.91$
$F_5-F_6 - 2.54$		$F_5-F_5 + 3.06$

In such calculations it is primarily taken for granted that the two means which are to be compared are alike. If this is correct, a  $t$  of at least 1.96 will be found in only about 5 % of the cases (4 Table 3). For this reason, the hypothesis is usually discarded when  $t \geq 1.96$ .

For this material it means that there is a significant rise in the height of the titer within the good strain until the 3rd generation, insignificant variations in the next two generations, and a distinct decrease in the antitoxin production in  $F_6$ .

One might feel tempted to look upon the rise in the first three generations and the stagnation in the next two as proof that the height of the titer was dependent on hereditary factors and brought to its maximum in  $F_3$  through selection and inbreeding. This assumption is disproved, however, by the fall in  $F_6$ .

It has not been possible to find any reasonable explanation of this fall. On going through the surrounding controllable factors, the experimental conditions appear not to have undergone any change. Thus, there has been no accidental accumulation of offspring in the seasons unfavorable to the

antitoxin production, and deaths from intercurrent affections have not been more frequent in this than in the preceding generations. If so, it would have indicated a general degeneration of the strain. So the fall in titer cannot be explained simply as a phenotypical change brought about by the experimental conditions. On the other hand, it was to be expected that a genotypical change resulting from the inbreeding and selection would have manifested itself at any rate by a maintenance of the antitoxin level that the animals had attained. This instance lends support to the objection raised (on p. 3) to the employment of the height of the titer as a genetic indicator.

The antitoxin production in the producers in the poor strain has not changed under the selection and inbreeding. Here the variations in the height of the titer from one generation to another have only been insignificant.

On the other hand, there is a distinct difference between the corresponding generation in the two strains, except in  $F_1$ , the producers of the good strain in the following 4 generations producing more antitoxin in response to the same amount of antigen than do the producers of the poor strain.

### *Seasonal Variations.*

In the present studies, where it has been possible by employment of the same anatoxin for immunization of all the animals to carry through the experiment with a constant dose of antigen, and where the intracutaneous titration method affords a biologically accurate expression for the effect, while continuous inbreeding of animals with known antitoxin content is rendered practicable by the safe treatment, the conditions should be the best possible for a decrease in — or elimination of — any influence from extraneous non-specific factors. Nevertheless, there will always be some circumstances that cannot be avoided, and which may influence the outcome of the experiment to some extent. Here, no doubt, the most important factor of this kind is to be found in the



aforementioned seasonal variations, that is, the dependency of the antitoxin production on the seasons. This, which is a well-known fact in immunization of guinea-pigs against diphtheria, has been described in detail by Th. Madsen and Schmidt (13) and by Schmidt and Fjord-Nielsen (20) who showed that the antitoxin production is distinctly weaker in animals immunized in the winter and spring than in animals immunized in the summer and autumn, and also that an extra addition of vitamins to the winter food resulted in some increase in the antitoxin production though not sufficient to counterbalance the difference.

In the experiments here described, as mentioned, each pair of animals were kept in experiment for two years, in order to ensure that the immunization periods for the offspring in each generation were distributed fairly equally over the various seasons.

Table 3 shows this distribution and the number of non-producers in each period. The aforementioned previous experiments (13, 20) had shown that the most favourable time of the year for diphtheria immunization falls in the months of August, September and October. For this reason, in Table 3 the year is divided into quarters, commencing with the month of February. The immunization period is reckoned from the day on which the injection of antigen was given, so that, for instance, animals immunized in April are reckoned under the 1st quarter, even though the sample of blood was not taken till some day in the month of May.

The number of immunized animals varies a good deal from one quarter to another, but on the whole their distribution may be said to be fairly equal for both strains. The few non-producers in the good strain are found chiefly in the 1st and 4th quarters in all six generations, and thus we cannot leave out of consideration the possibility that their failing antibody formation might have been a phenotypical variation due to the unfavorable season, rather than a genotypical difference, making the strain actually more pure than indicated by the percentage in general. On the other hand, the

Table 3.  
Total Number of Immunized Young and of Non-producers  
per Quarter Year.\*)

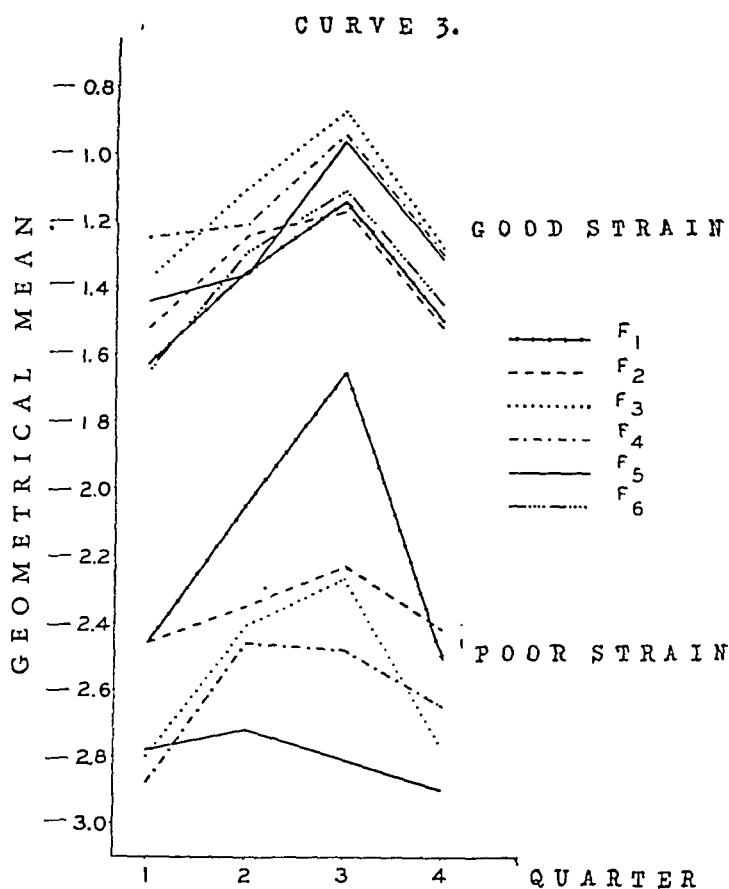
	1' Quarter 2'—4' months	2' Quarter 5'—7' months	3' Quarter 8'—10' months	4' Quarter 11'—1' months
Good strain				
F <sub>1</sub>	1/12 (2.4%)	1/32 (3.1%)	0/24 (0)	1/21 (4.8%)
F <sub>2</sub>	1/39 (2.5%)	1/25 (4%)	2/31 (6.7%)	8/54 (14.8%)
F <sub>3</sub>	1/14 (7.2%)	0/30 (0)	1/37 (2.7%)	2/28 (7.2%)
F <sub>4</sub>	1/35 (2.9%)	0/27 (0)	0/51 (0)	2/41 (4.9%)
F <sub>5</sub>	4/20 (20%)	1/15 (6.7%)	1/40 (2.5%)	1/24 (4.2%)
F <sub>6</sub>	1/10 (10%)	0/11 (0)	0/16 (0)	2/21 (9.5%)
Poor strain				
F <sub>1</sub>	15/25 (60%)	6/21 (28.6%)	3/13 (23.1%)	11/16 (68.7%)
F <sub>2</sub>	21/32 (65.5%)	23/45 (51.3%)	30/59 (51%)	24/42 (57.1%)
F <sub>3</sub>	37/45 (82.3%)	18/27 (66.6%)	45/86 (52.3%)	55/67 (82%)
F <sub>4</sub>	26/29 (90%)	14/18 (77.7%)	42/68 (61.7%)	35/47 (74.4%)
F <sub>5</sub>	5/6 (83.5%)	11/13 (84.5%)	16/19 (84.2%)	29/31 (93.5%)

occurrence of non-producers in the most favorable period — the 3rd quarter — as late as F<sub>5</sub> has to be interpreted as evidence of a not complete homozygosis. No essential shift appears to take place in the distribution in the course of the generations, but the small number of non-producers naturally precludes any decisive estimation of this point.

In the poor strain, F<sub>1</sub> shows a distinct decrease in non-producers in the two summer quarters, but in the following generation the difference between the quarters diminishes more and more, and in the fifth generation it is all gone. So the marked increase in non-producers in this strain can-

\*) The figure to the right of the stroke gives the total number of young that were immunized in the respective quarter. The figure to the left of the stroke gives the number of the young that did not produce a measurable amount of antitoxin. The percental proportion of the latter is given in brackets.

not be attributable to any accidental aggregation of young in the periods most unfavorable to antitoxin production; it has to be ascribed to an increase in homozygosis with regard to lacking genes for antitoxin production due to the selection and inbreeding.



Curve 3 gives for each quarter the antitoxin titer observed expressed by the logarithm of the geometrical mean for all the titers in each period. In the case of the good strain, the seasonal variations are plainly evident. A commencing rise in the titer is seen in the 2nd quarter, reaching a pronounced maximum in the 3rd quarters, and falling markedly in the 4th and 1st quarters, which are fairly alike in this respect. The curves for the sixth and first generations are practically identical. Evidently

the inbreeding and selection have not been able to alter the mode of reaction of the strain to the conditions resulting in the seasonal variations. This is quite in harmony with the quoted experiments reported by Prigge (15) who states that all his strains showed typical seasonal variations.

The immunization curve for  $F_1$  of the poor strain shows the usual typical form. The curve for  $F_2$  is more flat; still, like that for  $F_3$ , it has its maximum in the 3rd quarter.  $F_4$  shows about the same height of titer in the 2nd and 3rd quarters, when it is still distinctly higher than in the winter period, whereas the curve for  $F_5$  is strikingly flat, with merely an inconspicuous maximum in the 2nd quarter. This might indicate that the antitoxin-producing faculties in this strain gradually are so poorly developed that the stimulance associated with the summer quarters is no longer sufficient to produce any demonstrable increase in the effect of the antigen injection.

### *Discussion.*

In the aforementioned (p. 3) work by Theobald Smith (22) it says that the observed increase in resistance to injection of toxin is due to passive immunity transmitted from the mother to the young. My experiments, involving exclusively the young of actively immunized mothers, naturally imply the possibility that the antitoxin found in the offspring may have been of passive nature. The most rational way of ensuring against this possibility would have been to take a sample of blood from all the young prior to the active immunization and determine the antitoxin content of the blood at that time. The procedure of heart puncture itself is associated with a certain mortality percentage, however, and for this reason I did not wish to take more samples of blood than absolutely necessary. Both Theobald Smith (22) and Südmersen & Glenny (23) state that the congenital passive immunity is not demonstrable for more than 2—3 months at the most. In my experiments the young were actively im-

munized at this age, and no sample of blood for antitoxin determination was taken until one month later, that is, at a point of time when all passive antitoxins should have been excluded. Südmersen & Glenn (23) further state that the active immunity of the mother is not demonstrable after a period of about two years, and that the congenital immunity of the offspring and its duration depend on whether they are born early or late in the immune period. If in my experiments the antitoxin found in the young had been of passive nature, it would have been possible to ascertain a fall in the height of the titer in the litters that were born last in the 2-year experimental period. This was not the case, however, and hence I have found it warrantable to leave a possible passive immunity out of consideration.

Considered the reported results under one, I think they have to be taken to prove that the capacity for antitoxin production as well as its absence in guinea-pigs is of hereditary nature. By selection and inbreeding it has been possible to separate the two properties, although this did not result in isozygosis in either strain. In view of the relatively few generations here involved, this is really not surprising, for according to calculations reported by other investigators (*e. g.*, Schäfer, 19) the production of isozygosis requires at least 30 generations. Whether the reaction be due to several hereditary factors or depend on a single gene, is not decisively evident from these experiments, but the strong influence of the inbreeding in the course of a few generations is not suggestive of any complicated gene construction.

Nothing is found to suggest that here we are dealing with a sex-linked property as all calculations concerning the distribution of producers and non-producers, as well as the height of the titer, turned out alike for males and females.

I have not considered my strains sufficiently pure for the performance of crossing experiments. Therefore, the material offers merely certain suggestions as to the mode of inheritance of this property. The fact that one generation in the good strain brought the number of antitoxin producers up to over 90 %, while in the poor strain it took five generations

to obtain a similar high percentage of non-producers, is suggestive of dominance of the antitoxin-producing faculties. This is in harmony with the view of the aforementioned authors (9, 17).

The two strains showed no difference in the increase in weight. In both strains the fertility decreased in the course of the generations as  $P_1$  of the good strain had on an average 13 young per pair as against 7 in  $P_6$ , and the poor strain had 16 in  $P_1$  as against 6 in  $P_5$ .

An analysis of the deaths from intercurrent lesions showed no increase in their number in the course of the generations for the F animals — *i. e.*, animals with an observation period of only 2—4 months. In both strains the number of such cases varied between 3 % and 10 % in the various generations. On the other hand, the P animals, with an observation period of about two years, showed a distinct lowering of the resistance in the last generation. Here the number of intercurrent deaths increased from 15 % for  $P_1$  to 50 % for  $P_6$  in the good strain, and from 20 % for  $P_1$  to 38 % for  $P_5$  in the poor strain.

I have not had occasion to try out the reaction of the two strains to other antigens, and thus it has not been ascertained whether the demonstrated differences in faculty for immunization are specific of the diphtheria antigen. But the intercurrent deaths, which most often were due to pneumonia — and in a few cases to pseudotuberculosis — have been distributed evenly among the two strains in all generations, showing that the resistance to certain bacterial infections is independent of the hereditary factors governing the production of diphtheria antitoxin.

### *Summary.*

By selection and inbreeding of guinea-pigs in which the diphtheria antitoxin content of the serum was known, it has been possible to segregate an accidental guinea-pig population into a good strain and a poor strain of antitoxin producers.

## REFERENCES

1. *Bradford Hill*: Med Res. Council. Spec. Rep. 196, 1931.
2. *Bundesen*: J. A. M. A. 64: 1203, 1915.
3. *Bühler*: Verhandl. d. deutsch. Gesellsch. f. inn. Med. 49: 368, 1937.
4. *Fisher & Yates*: Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research. London, 1938.
5. *Gebbing*: Deutsches Arch. f. klin. Med. 178: 472, 1936.
6. *Gottstein*: Berlin klin. Wchnschr. 30: 591, 1893.
7. *Graff & Ginsberg*: J. A. M. A. 64: 1205, 1915.
8. *Hirszfeld & Hirszfeld*. Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap. 54: 81, 1928.
9. — Ztschr. f. d. ges. Hyg. 34: 1, 1935.
10. *Jacobi*: H. d. Kinderheilkunde. 2: 703, 1877.
11. *Jensen, Claus*: Acta path. et microbiol. Scandinav. Suppl. 11, 1933.
12. *Kühn*: Vortrage über Erbbiologie in Frankfurt, 1935. Leipzig, 1935.
13. *Madsen, Th. & Schmidt*: Acta Soc. med. fenn. duodecim. 15: 1, 1932.
14. *Park, Zingher & Lerota*: Arch. Pediat. 31: 481, 1914.
15. *Prigge*: Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr. 119: 186, 1937.
16. *Rist & Weiss*: Ann. Med. 12, 356, 1922.
17. *Rosling*: Zeitschr. f. in. Abst. & Verehrbl. 52: 88, 1929.
18. *de Rudder*: Fortschr. d. Erbpath. & Rassenhyg. 1: 149, 1937—38.
19. *Schäfer*: Zeitschr. f. in. Abst. & Verehrbl. 72: 50, 1936.
20. *Schmidt & Fjord-Nielsen*: Acta path. et microbiol. Scandinav. 11: 127, 1934.
21. *Smith, Theobald*: J. Med. Research. New Series 8: 341, 1905.
22. — J. Med. Research. New Series 11: 359, 1907.
23. *Südmersen & Glenney*: J. Hyg. 11: 220, 1911.
24. *v. Vershuer*: Erbpathologie, 1937.
25. *Weitz*: Erbarzt, 8: 1936.
26. — Die Vererb. inn. Krankh. 1936.

*FROM THE RADIUM STATION, COPENHAGEN (CHIEF: JENS  
NIELSEN) AND THE SURGICAL DEPARTMENT C (UNIVERSITY  
OF COPENHAGEN), THE STATE HOSPITAL (CHIEF SURGEON:  
PROF. E. DAHL-IVERSEN, M.D.)*

---

## ON THE DEMONSTRATION OF NEOPLASTIC CELLS IN THE SPUTUM\*)

By *H. H. Wandall.*

(Received for publication June 26th 1942).

During the last decade various reports on the occurrence of neoplastic cells in the sputum have been published by English authors (Dudgeon & Wrigley, Roodhouse Gloyne, Barrett).

It appears from these works that neoplastic fragments are demonstrable in the sputum in a large number of cases of malignant tumours localized in the respiratory tract, and that the histological type of the tumour may as a rule be distinguished on the basis of the findings in the sputum.

The method used for preparing the specimens for cytological examination is the following modification (Roodhouse Gloyne) of that of Dudgeon & Wrigley: 6 film preparations are made from each specimen. The wet-films are fixed for 20 minutes in Schaudinn's fluid (one volume of absolute alcohol to two volumes of saturated aqueous solution of mercuric chloride with a couple of drops of glacial acetic acid added immediately before use). By thereupon transferring the slides to methylated spirit to which a few drops of tincture of iodine have been added and leaving them immersed for 20 minutes the excess of mercuric chloride is washed out. The excess of iodine is removed by covering the slides for 5 minutes with a solution con-

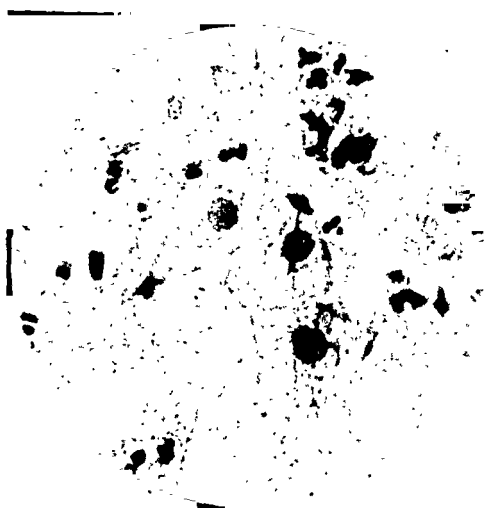
---

\*) This work was carried out with support from The Danish Anti-Cancer League.



sisting of sodium thiosulphate, 7,5 gm., alcohol 96 %, 100 gm., and distilled water, 450 gm. The preparations are then thoroughly washed in water and stained with hematoxylin (Hansen or Mayer) for 2 minutes, whereupon they are counterstained with eosin 1 % for 3 minutes. They are then dehydrated with alcohol in increasing concentrations and cleared with xylol-dammar.

The sputum from cases of slight, unspecific inflammatory changes in the respiratory tract contains epithelial cells of



*Fig. 1.*

Large epithelial cells from the oral cavity or pharynx as well as quite considerably degenerated leucocytes.

different origin, emigrated blood-cells and phagocytizing cells.

The epithelial cells are of various types according to their point of origin. From the oral cavity and the pharynx one encounters large, polygonal epithelial cells with an abundant, easily eosinophil cytoplasm and a small, dark, centrally placed nucleus (Fig. 1). From the nasal cavity, the trachea, and the bronchi there will be columnar epithelial cells with basally placed, fairly large, dark nuclei (Fig. 2). In the preparations the epithelial cells are frequently lying in plaques of 3—4 with contiguous borders.

The cells migrating from the blood stream, leucocytes,

lymphocytes and erythrocytes, look much the same as in other parts of the organism; the leucocytes are, however, frequently the seat of degenerative phenomena (Fig. 1 and 2).

The phagocytosing cells (macrophages) encountered in the sputum are the cells which formerly were termed alveolar epithelia. These are large cells, rich in protoplasm, with round or oval nuclei. The latter are rather small compared with the size of the cell and their structure is loose with a distinct



*Fig. 2.*

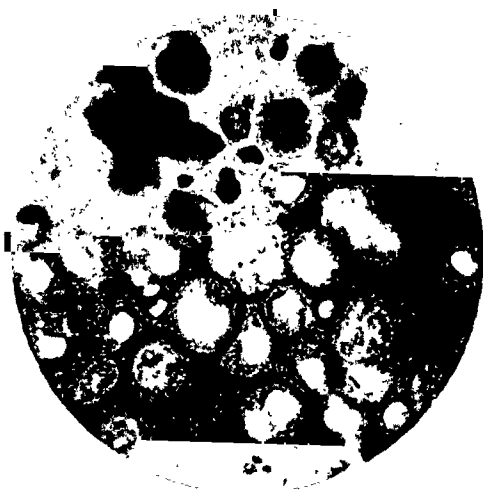
Cylindric epithelial cells from the trachea or bronchi. Leucocytes well-preserved.

nuclear membrane and as a rule one single nucleolus (Fig. 3). In the frequently vacuolated cytoplasm one may find phagocytosed particles, coal dust, blood pigment (heart failure cells), or cell remains, e. g. erythrocytes or leucocytes. These are often encountered in the preparations in lumps or strands, clustered together with contiguous borders, but never adhering to the neighbouring cells.

In cases of more pronounced inflammatory conditions of the bronchi and lung parenchyma, other varieties of cells may be met with, but as a rule the process is represented in

the sputum by an increased number of the white blood corpuscles and the macrophages. In case of hemoptyses there will be numerous erythrocytes.

Any tumour localized so that its surface reaches the inside of the respiratory tract — whether this be due to the fact that this is its primary site or it has ulcerated through the mucous membrane from without — is capable of causing neoplastic cells in the sputum. Findings of malignant cells

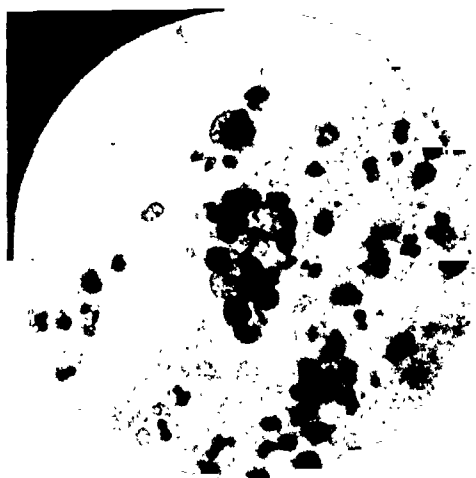


*Fig. 3.*  
Macrophages.

in the sputum may thus be due to a carcinoma of the oral cavity, the larynx, or the lungs. On account of the easy accessibility to the carcinomas of the oral cavity and the larynx the cytological examination of the sputum from these diseases will hardly attain the same degree of importance as in cases of pulmonary carcinoma.

The relation of the cells to the surrounding tissue, i. e. the invasive growth, is one usual sign of malignancy which is missing in the sputum. One can only base one's conclusions on the appearance of the cells which depends upon the type of the tumour from which they arise. At the same

time, however, there are certain common features which in a decisive manner distinguish neoplastic from normal cells. In the preparations the neoplastic cells are most frequently encountered in clusters and mutually adherent. The size of the individual nuclei is strikingly large compared with those of normal cells. Finally, the nuclei of the individual cells exhibit the characteristic diversity in form, size, and staining quality. One striking feature is the frequent occurrence of



*Fig. 4.*  
Cells from an oat-celled carcinoma.

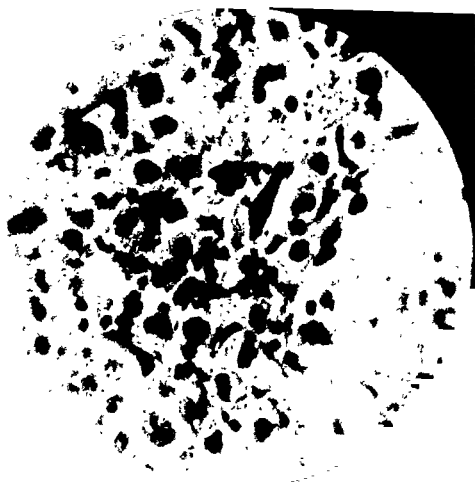
large nucleoli which are often encountered in numbers of 2—3 in one nucleus.

According to appearance the cells encountered in cases of primary pulmonary carcinoma may be classified into two groups: those originating from an undifferentiated type of tumour (anaplastic carcinoma) and those arising from the more differentiated types (columnar, and squamous epithelial-celled carcinomas).

The cells of the undifferentiated types (Fig. 4) contain a small amount of cytoplasm around the very large, chromatinous, round nucleus. Frequently the cytoplasm has been

destroyed, probably on account of autolysis in the sputum, so that one encounters the bare nuclei in strands. The nuclei present only a slight diversity in form, but a pronounced difference in size and chromatin density.

In sputa from cases of the more differentiated types the cells are of an altogether different appearance on account of the fairly abundant, eosinophil cytoplasm (Fig. 5). On the whole the nuclei are large, presenting considerable variation



*Fig. 5.*

Cells from a more differentiated type of tumour.  
Squamous-celled carcinoma.

in form, size, and chromatin structure; the nucleoli are often extremely conspicuous. In these types the sputum often contains special cells the presence of which allows of a further type diagnosis. In the adenomatous types there may be large cells with secretory vacuoles (Fig. 7) and in the keratinising squamous-celled carcinomas one frequently meets with round-cell formations giving evidence of the tumour's keratinisation (Fig. 6).

In cases of secondary pulmonary tumours it is moreover often possible to demonstrate neoplastic cells in the sputum

(Fig. 8). The appearance of these cells which depends upon the origin of the primary tumour as a rule differs considerably from the appearance of cells derived from primary pulmonary tumours.

In the course of 1941 the two Departments (The Radium Station and Dept. C (Surgical) of the State Hospital) have



*Fig. 6.*

Round-cell formation (Bird's eye cell).

made examinations of the sputum from 60 cases which may be tabulated as follows:

Primary pulmonary carcinoma .....	30
secondary   "                   " .....	5
benign bronchial tumour.....	1
bronchiectases .....	4
inflammatory conditions (abscess, bronchitis, empyema, actinomycosis, tuberculosis) ..	20

Out of the 30 cases of primary pulmonary carcinoma 22 were confirmed histologically, while the remaining 8 are roentgenologically positive, i. e. bronchostenosis and atelectasis with elevation of the diaphragm on the affected side as well as a shift of the mediastinum have been demon-

strated. In 19 out of the 22 histologically confirmed cases and in 7 out of the 8 roentgenologically positive ones neoplastic cells were demonstrated in the sputum. In the case of the benign bronchial tumour neoplastic cells could not be demonstrated in the sputum. Among the cases of metastases to the lung neoplastic cells were found in the sputum in



*Fig. 7.*

Cell with a secretory vacuole from an adenocarcinoma.

case of metastases from osteosarcoma, hypernephroma, ovary carcinoma, and seminoma.

In one case a diagnosis of »neoplastic cells« was made without any tumour being found. The histological examination from the autopsy revealed that it was a question of a chronic fibrous pneumonia with development of a cuboid epithelium in the alveoli. These were the cells that gave occasion to the mistaken diagnosis as they were present in the sputum in plaques in a manner similar to the neoplastic cells with nuclei revealing some polymorphism and polychromatophilia. The case is among the first 10 examinations, and the error made is exclusively due to lacking experience. Dudgeon & Wrigley report a similar mistake in their work. There it

was a question of a patient suffering from chronic sinusitis and a polyp in the nasal cavity — which had caused plaques of epithelial cells in the sputum on the basis of which a diagnosis of carcinoma was established.

The frequency of the presence of neoplastic cells in the sputum is probably dependent on 3 factors: The extent, localization, and histological type of the tumour.



*Fig. 8.*

Cluster of cells from a case of seminoma metastases in the lung.

Judging from the present material the extent of the tumour does not yield a safe indication. Out of the 22 histologically verified cases 13 were absolutely inoperable, i. e. either metastases were demonstrable, or bronchoscopy revealed that the tumour had spread so far up towards the trachea that an operation would be impracticable. In 12 out of these 13 cases neoplastic cells were demonstrated in the sputum. In the remaining 9 cases it was decided to operate. During the operation 7 cases — 5 of which had neoplastic cells in the sputum — proved to be inoperable, while a radical operation could be carried through in 2 cases — both of which had neoplastic cells in the sputum.



As regards the localization of the tumour one might expect that the tumours localized to the big bronchi most frequently should give rise to the presence of neoplastic cells in the sputum. According to the material at hand this is, however, not the case. Among the 22 histologically verified cases there were 2 — the one operable, the other revealed to be inoperable by an explorative thoracotomy — both of a peripheral localization, and both with neoplastic cells in the sputum.

The significance of the histological structure seems to be a somewhat different matter. In the present material neoplastic cells have proved more frequently demonstrable in the differentiated than in the undifferentiated types. This circumstance most probably finds its natural explanation in the fact that it is often possible to diagnose isolated cells from e. g. a squamous-celled carcinoma as carcinoma cells, while isolated cells from the undifferentiated types cannot with any certainty be distinguished from the normal cells of the sputum, especially leuco- and lymphocytes.

It is evident from the foregoing that in cases of pulmonary tumours characteristic neoplastic cells are frequently present in the sputum. The cytological examination of the sputum, therefore, has a possibility of becoming a useful supplement to the roentgenological and bronchoscopic examinations in the diagnosis of primary pulmonary carcinoma.

#### REFERENCES

- (1) *Barrett, N. R.*: Journ. Thoracic Surg. 1938/39, Vol. 8, p. 168.
- (2) *Dudgeon, L. S. & Wrigley, C. H.*: Journ. Laryngology & Otology 1935, 50, p. 752.
- (3) *Roodhouse Gloyne, S.*: Tubercle 1937, p. 292.
- (4) — Tuberculosis Abstracts, 1939, 12.

(AUS DEM BAKTERIOLOGISCHEN INSTITUT  
(DIREKTOR: PROFESSOR, DR. A. LINDAU)  
UND DER VENEREOLOGISCHEN KLINIK  
(CHEFARTZ: DOZENT DR. G. GLIMSTEDT) ZU LUND.)

---

## DIE BEDEUTUNG DER GONOKOKKENKULTUR FÜR DIAGNOSE UND BEHANDLUNG DER GONORRHÖE

(NEBST EINER ÜBERSICHT ÜBER DIE BEDEUTUNG DER  
CHEMORESISTENZ)

Von Gösta Hagerman.

(Bei der Redaktion am 11. 7. 1942 eingegangen).

Eine frische Gonorrhöe bereitet gewöhnlich keine grösseren diagnostischen Schwierigkeiten. Die Direktprobe, d. h. das übliche Ausstrichpräparat von Sekret verschiedener Entnahmestellen zur mikroskopischen Untersuchung liefert ein durchaus charakteristisches Bild, auf Grund dessen die sichere Diagnose gestellt werden kann. Bei einer chronischen oder latenten Gonorrhöe dagegen, namentlich bei der Frau, können die diagnostischen Schwierigkeiten erheblich sein. Seit langem hat man den Eindruck, dass die Direktprobe als einziges Kriterium der Diagnose in diesen Fällen nicht restlose Sicherheit gibt. Erstens kann das mikroskopische Bild, auch bei Gramfärbung, bisweilen sehr schwer zu beurteilen sein, zum andern kann verhältnismässig oft der Nachweis von Gonokokken in der Direktprobe misslingen, obwohl der Anamnese oder dem klinischen Bilde nach wahrscheinlich ein Tripper vorliegt. Lange hat man deshalb nach Methoden gesucht, die

---

Nach einem Vortrag vor der Lunder Ärztgesellschaft am 25. Nov. 1941.

eine erhöhte diagnostische Sicherheit bei Gonorrhöe schenken könnten, und vor allem hat man verschiedene Kulturmethoden ausprobiert. Erst in den letzten Jahren jedoch sind diese Gonokokkenkulturverfahren technisch so vervollkommen worden, dass die Gonokokkenkultur als diagnostische Methode praktisch brauchbar geworden ist. Besonders seit Einführung der Chemotherapie hat sich der Kulturversuch in verschiedener Hinsicht sowohl bei der Diagnose als bei der Behandlung des Trippers als ein wertvolles Hilfsmittel erwiesen. Es mag daher gerechtfertigt sein, einen Überblick über die in den letzten Jahren durch Gonokokkenkulturversuche gewonnenen Erfahrungen zu geben und zugleich unsere Lunder Ergebnisse vorzulegen.

### *Geschichtliches.*

Schon im Jahre 1885 gelang es Bumm als erstem, Gonokokken auf wärmeokoagulierte menschliche Serum zu züchten. Wertheim führte den Serumagar als besseren Nährboden ein. Seitdem sind zahlreiche neue Nährböden und Kulturverfahren ausprobiert worden, ohne wesentlich verbesserte Ergebnisse zu liefern. Ohne grössere Schwierigkeit ist es gelungen, Gonokokken von frischen Fällen, die einen gonokokkenreichen Eiter absonderten, zu isolieren und weiterzuzüchten. Dagegen konnte man nicht mit Bestimmtheit positive Resultate erzielen in Fällen mit Sekundärinfektion oder solchen Fällen, wo die Gonokokken in den Direktproben spärlicher oder intermittent vorkamen. Der Kulturversuch war also diagnostisch nur wenig aufschlussreicher als die Direktprobe.

Im Jahre 1934 legten indessen McLeod und seine Mitarbeiter (24) ihre Erfolge mit einem neuen Kulturverfahren, das bedeutende Verbesserungen brachte, vor. Sie arbeiteten mit einem neuen Nährboden, der auf 80° C erhitztes Pferdeblut enthielt und seiner Farbe wegen Schokoladenagar genannt wurde. Ferner machten sie sich die Fähigkeit der Gonokokken zunutze, mit Tetramethylparaphenylendiaminhydrochlorid eine Oxydasereaktion zu ergeben, was besonders den Nach-

weis weniger Gonokokkenkolonien in einer reichen Mischflora in den Kulturen erleichterte. Schliesslich wiesen sie darauf hin, dass gewisse Stämme nur in kohlendioxydhaltiger Atmosphäre ein Wachstum zeigten. Erst mit dieser Technik ist die Gonokokkenkultur als ein praktisch brauchbares diagnostisches Verfahren anzusehen.

Im Jahre 1936 führte Neumann (29) die sog. A-, C-, D-Platten ein. Diese enthielten Pferdeblut-Wasser-Agar und wurden luftdicht abgeschlossen, zudem wurde die Atmosphäre in der C-Platte sauerstoffarm, in der D-Platte sauerstoffarm und kohlendioxydreich gemacht. In der A-Platte wurde gewöhnliche Luft verwendet. Neumann gab an, etwa 30 % der Gonokokken hätten in den A-Platten kein Wachstum gezeigt. Neumanns Methodik ist an vielen Orten, namentlich in Deutschland, eingeführt worden, während McLeods Verfahren in England und Amerika das gebräuchlichste ist.

In Skandinavien wertete Reymann die Gonokokkenkultur als diagnostisches Verfahren in grösserem Massstabe am Kopenhagener Seruminstitut aus. Seine ersten Ergebnisse veröffentlichte er 1939 (33). Reymann fand (35) McLeods Schokoladenagar einwandfrei besser als den von Neumann benutzten Nährboden. Ausserdem setzte er 33 % Aszites zu und erzielte mit diesem modifizierten Aszites-Schokoladen-Agar sehr gute Erfolge. 1940 führte Reymann (34) mit seinen Gläsern für den Probenversand eine wichtige praktische Verbesserung ein. In den besagten Glasröhren lassen sich die Gonokokkenproben verschicken und 12 Stunden aufbewahren, ohne dass die Kulturergebnisse darunter leiden. Dank dieser Verbesserung ist nunmehr jedem praktischen Arzt, der nicht über eine Tagereise von dem nächsten für Kulturversuche eingerichteten Laboratorium entfernt wohnt, die Möglichkeit gegeben, seine Proben zur Gonokokkendiagnose an das betreffende Laboratorium einzuschicken. In seiner kürzlich erschienenen Dissertation (35) kommt Reymann u. a. eingehender auf die theoretischen Voraussetzungen der Gonokokkenkultur zu sprechen. Betr. Einzelheiten in bezug auf Nährböden und Züchtungstechnik verweise ich auf diese Arbeit.

Zur Erzielung eines optimalen Gonokokkenwachstums sind die nachstehend aufgeführten Punkte zu beachten:

1. Im Thermostat muss die Temperatur etwa 36,5° C sein. Schon eine leichte Temperaturerhöhung kann bewirken, dass besonders empfindliche Stämme nicht zum Wachstum kommen.

2. Der Nährboden (stets in fester Form) muss genügend weich und feucht sein, bei kleinstmöglichem Agargehalt. Reymann (35) gibt 1941 einen Agargehalt von 1,2 % an, doch dürfte dieser bisweilen erhöht werden müssen, je nach der Güte des Agars. pH am besten etwa 7.4—7.5.

3. Am besten soll der Nährboden nicht-koaguliertes menschliches Eiweiss enthalten, z. B. Aszites, Hydrozeleflüssigkeit oder Blut.

4. Die Anwesenheit von Aminosäuren in höheren Konzentrationen oder von autoklaviertem Pepton in den Nährböden hat eine hemmende Wirkung, die indessen u. a. durch einen Zusatz von auf 80° C erhitztem Pferdeblut (wie in McLeods »Schokoladenplatten«) aufgehoben werden kann.

5. Die Züchtung ist in geschlossenen Gefässen mit feuchter Luft, die 8—10 % Kohlendioxyd enthält, vorzunehmen.

Am wichtigsten scheint die ausreichende Feuchtigkeit des Nährbodens und der Luft zu sein. Die Aufgabe des Kohlendioxyds liegt vielleicht hauptsächlich in einer Regulierung des pH, doch haben McLeod (24) und Reymann (35) gezeigt, dass gewisse Stämme in Gegenwart von Kohlendioxyd besser wachsen als wenn dieses fehlt, wenigstens bei der ersten Züchtung. Auch für den Transport der Proben scheint die Feuchtigkeit wichtig zu sein, weshalb die Versandgläser neben dem Nährboden ein wenig Kondenswasser enthalten und luftdicht verschlossen sein müssen.

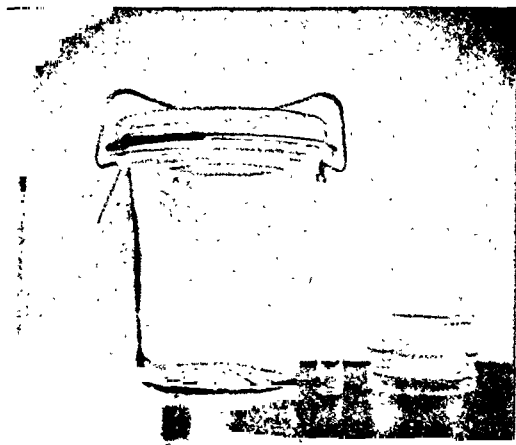
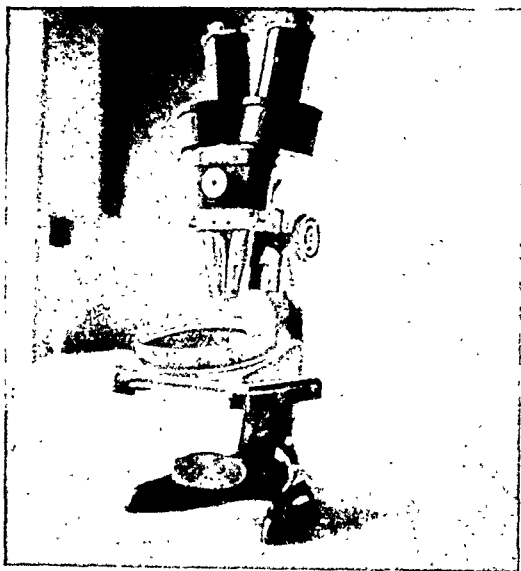
Am Bakteriologischen Institut in Lund begannen wir Gonokokkenkulturen im November 1940 auszuführen, hauptsächlich nach dem Verfahren des Kopenhagener Serum Instituts.\*)

Einige kleinere technische Veränderungen dürften Erwähnung verdienen:

Statt spezialkonstruierter und verhältnismässig kostspieliger Spezialgefässe machen wir die Kulturversuche in gewöhnlichen Konserviergläsern von konischer Form und einem Rauminhalt von

---

\*) Für die Bereitwilligkeit, mit der mir Gelegenheit geboten wurde, im Oktober 1940 das Kulturverfahren des Instituts an Ort und Stelle kennenzulernen, sowie für die mir dabei erwiesene Hilfe danke ich an dieser Stelle herzlichst.

*Abb. 1.**Abb. 2.*

1.5 l (geliefert von Boda Glasbruk). Siehe Abb. 1. Auf dem Boden des Glases wird als Stütze für die Platten ein umgestülptes Glas aufgestellt, ferner werden ein paar Milliliter Wasser, einige Gramm Bikarbonat in Substanz sowie ein Röhrchen mit 3 ml 1-molarer Schwefelsäure in das Konservierglas gegeben. Das Röhrchen wird zum Stürzen gebracht, so dass es seinen Inhalt über das Bikarbonat entleert, worauf der Deckel des Glases während der Kohlendioxyd-entwicklung für einen Augenblick geöffnet wird. Dabei entweicht ein Teil der Luft und das Gasgemisch erhält die richtige Zusammensetzung.

Bei der Betrachtung der Kolonien unter dem Präpariermikroskop werden die Platten auf einen schrägen hölzernen Klotz gebracht, der auf dem horizontalen Tisch des Mikroskops verschoben werden kann (Abb. 2). Dadurch ist es möglich, die ganze Platte schnell in schräg auffallendem Licht zu untersuchen, was die Auffindung der Gonokokkenkolonien sehr erleichtert. Auch bei sonstiger bakteriologischer Arbeit unter dem Präpariermikroskop empfiehlt sich diese einfache Vorrichtung für schräge Beleuchtung, und in vielen Fällen dürfte sie andere, bedeutend kostspieligere Vorrichtungen mit »Kugelgelenk« u. dgl. übertreffen.

Schliesslich wurde als Indikator bei den Gärungsreaktionen Phenolrot verwendet, das sehr deutliche Umschläge liefert.

### *Methodik:*

Die Proben werden mit Holzstäbchen entnommen, die mit Watte umwickelt sind. Die Proben werden dann, ohne abgestrichen zu werden, in Röhrchen mit Schräg-Aszites-Schokoladen-Agar nach McLeod-Reymann gebracht. Die Röhrchen werden luftdicht verschlossen, z. B. mit einem Gummistöpsel, und dann an das Züchtungslaboratorium eingeschickt, und zwar am besten so, dass sie innerhalb von 12 Stunden nach Entnahme der Probe in Arbeit genommen werden können. Mit den Stäbchen macht man Ausstriche auf Aszites-Schokoladen-Agar in Petrischälchen, worauf die Platten in die obenbeschriebenen Kulturgefässe mit feuchter Luft, 8–10 % Kohlendioxyd enthaltend, gebracht werden. Nachdem die Platten 24 Stunden im Thermostat gewesen sind, werden sie im Präpariermikroskop untersucht.

Die Gonokokkenkolonien sind dann klein, meist unter 1 mm im Durchmesser, blank und glänzend, von der Form einer Halbkugel oder eines Öltröpfchens, farblos, doch auffallend dunkel. Sie haben eine etwas mukoide Konsistenz und haften leicht an der Platinöse. Versucht man, sie in Wasser aufzuschlämmen, so pflegen sie recht gut zusammenzuhängen und an der Platinöse zu haften. Wenn die

Kolonien etwas älter werden, sind sie grösser, flacher, bekommen mit der Zeit oft einen undulierenden, »polyzyklischen« Rand, und nahe der Peripherie sind sie bisweilen radiärgestreift. Die Kante fällt immer noch verhältnismässig steil zur Substratfläche ab, und das Zentrum der Kolonie erhebt sich oft gipfförmig, weshalb diese älteren Kolonien oft als »zeltförmig« beschrieben werden. Die Farbe ist jetzt schwach gelbgrau.

Verdächtige Kolonien werden auf neue Platten überimpft, worauf die alten Platten weitere 24 Stunden im Kulturgefäss bleiben, jetzt aber ohne Kohlendioxyd. Die überimpften Kolonien sind am besten in Kohlendioxyd unterzubringen, doch kann man in der Regel nach ein paarmaligem Überimpfen in gewöhnlicher, feuchter Luft (im Kulturglas) ein gleich gutes Wachstum erzielen.

Nach Verlauf des zweiten Tages werden die Platten wieder betrachtet, verdächtige Kolonien abgeimpft und dann, wenigstens auf reichlicher bewachsene, doch anscheinend negative Platten einige Tropfen frisch bereitete 1—2 % Lösung des Oxydasereagens, Tetramethylparaphenylendiaminhydrochlorid, geträufelt. Die Gonokokkenkolonien nehmen nach einigen Sekunden eine dunkelblauviolette Färbung an und sind dadurch auch in einer reichen Mischflora leicht zu erkennen. Die mittels dieses Verfahrens gefundenen Kolonien können nun überimpft werden, sind aber oft stark verunreinigt, weshalb man nach Möglichkeit die Gonokokkenkolonien ohne das Oxydasereagens aufzufinden versuchen soll. Die Oxydasereaktion ist nicht ganz spezifisch für Gonokokken. Auch verschiedene andere Gramnegative Kokken sowie gewisse Stäbchen sind oxydasepositiv.

Nachdem die gonokokkenverdächtigen Kolonien reingezüchtet worden sind und sich bei der Kontrolle als oxydasepositiv erwiesen haben, wird eine Gramfärbung gemacht. Zeigt diese Gramnegative Kokken von dem typischen Aussehen gezüchteter Gonokokken, so wird die Diagnose durch Gärungsreaktionen bestätigt. Diese fassen auf der Tatsache, dass die Gonokokken nur Glykose vergären, während von anderen Gramnegativen, oxydasepositiven Kokken die Meningokokken Glykose und Maltose vergären, *Diplococcus pharyngis* und *D. crassus* ausserdem Laevulose, während *Micrococcus catarrhalis* keine der genannten Zuckerarten vergärt.

Bei der Prüfung der Gärfähigkeit werden die einzelnen Stämme in reichlicher Menge auf eine Reihe von Aszitesagarplatten mit Glykose bzw. Maltose und Laevulose abgeimpft, sämtlich mit Phenolrot als Indikator. Nach 24 Stunden im Kulturglas (mit Kohlendioxyd) sieht man bei den Gonokokken in der Glykoseplatte einen deutlichen Umschlag in Gelb, während man in den übrigen Platten einen Umschlag in Violett erhält.



Die Diagnose gründet sich also auf:

1. Das typische Aussehen der Gonokokkenkolonien bei Untersuchung im Präpariermikroskop.
2. Die positive Oxydasereaktion.
3. Gramnegative Kokken von typischen Aussehen in Ausstrichen der Kulturen.
4. Den regelrechten Ausfall der Gärungsreaktionen.
5. In zweifelhaften Fällen kann die Überimpfung verdächtiger Kolonien auf gewöhnlichen Agar guten Aufschluss bieten. Sieht man ein Wachstum, so schliesst dies die Möglichkeit aus, dass es sich um Gonokokken handelt.

In günstigen Fällen lässt sich die vollständige Analyse bei positiven Proben in 3—4 Tagen durchführen. Bescheid über negativen Ausfall oder Verdacht auf positiven ist meist innerhalb von 2 Tagen nach Beginn der Bearbeitung zu erhalten.

Proben von Patienten, die mit Sulfonamidpräparaten behandelt worden sind, dürfen erst einige Tage nach Aufhören der Behandlung entnommen werden, da sonst die Kulturen negativ ausfallen können, selbst wenn in den direkten Proben gleichzeitig Gonokokken gefunden werden.

### *Ergebnisse:*

Um die unterschiedlichen Angaben verschiedener Untersucher über den diagnostischen Wert der Gonokokkenkultur beurteilen und vergleichen zu können, kann man, wie McLeod (24) vorgeschlagen hat, sich einer Quotenrechnung bedienen. Man registriert unter sämtlichen untersuchten Fällen teils, wie viele allein durch Züchtung sicher als Gonorrhöen erkannt worden wären, teils, wie viele positiv gewesen sein würden, wenn bloss die gewohnte Direktprobe gemacht worden wäre. Das Verhältnis zwischen dem Ergebnis mit Kultur und dem Ergebnis mit Direktprobe ist eine Quote, die einfach und recht zuverlässig die Überlegenheit der einen oder der anderen Methode ausdrückt.

McLeod und seine Mitarbeiter legten 1934 (24) eigene und verschiedene fremde Ergebnisse mit Kulturversuchen bzw.

Direktproben, in Quoten ausgedrückt, vor. Die gefundenen Zahlen wechselten stark; in einigen Fällen lag die Quote weit unter 1, in anderen erheblich über 1. McLeod selbst fand die Quote 1.87 bei Untersuchung von 361 Frauen mit Gonorrhöe. Unter den übrigen von McLeod zitierten Forschern seien Fröhlich und Jordan (10) erwähnt, die 1932 das Prostatasekret von 285 Männern mit Gonorrhöe untersuchten, nachdem die akuten Erscheinungen verschwunden waren und in der Direktprobe das Urethrasekret keine Gonokokken mehr zeigte. Sie fanden 72mal positive Proben mit einer Quote Kultur/Direktprobe = 4.7.

In den letzten Jahren sind Gonokokkenkulturversuche in immer grösserem Ausmass und durchweg mit sehr guten Erfolgen durchgeführt worden. Eine tabellarische Übersicht über einige Ergebnisse aus neueren einschlägigen Arbeiten (nebst meinen eigenen Zahlen) mag den heutigen Stand der Dinge beleuchten. (Wo die Originalarbeit keine Quoten angibt, sind diese zur Ermöglichung direkter Vergleiche von mir berechnet worden.)

Untersucher		Patientenmaterial, Stelle der Probenentnahme:	Anzahl d. pos. Proben oder Fälle	Quote Kultur
				Direkt- probe
McLeod u. a.	1934	Frauen, Urethra und Cervix	361 (Fälle)	1.87
Krückeberg	1937	Frauen, Urethra und Cervix	85	4.7
Neuman	1938	Frauen, Urethra und Cervix	700	2.55
»	»	Männer, Urethra	201	1.06
Felke	1938	Frauen, Cervix	326	1.5
Christiansen u. Becker	1938	Nachkontrolle chemotherapeutisch behandelter Patienten, Männer und Frauen	59	2.2
Carpenter u. Mitarbeiter	1938	Frauen, Urethra und Cervix	223	1.9
Reymann	1938	Frauen mit pos. Proben in Urethra, Cervix od. beiden	162 (Fälle)	2.1
»	»	Darunter Frauen, die als Ansteckungsquelle gemeldet waren	39 (Fälle)	3.3

Untersucher		Patientenmaterial, Stelle der Probenentnahme:	Anzahl d. pos. Proben oder Fälle	Quote Kultur
				Direkt- probe
Göhring	1939	Frauen, Cervix	85	2.11
"	"	Frauen, Urethra	79	1.57
"	"	Männer, Urethra	94	0.88
Engleson u. Engleson	1940	Frauen, Cervix	68	6.8
"	"	Frauen, Urethra	78	4.88
Wilde	1941	Prostituierte (Stelle der Pro- benentnahme nicht ange- geben)	264 (Fälle)	2.66
Uhle u. Mit- arbeiter	1941	Männer, Urethra- od. Pro- statasekret	248 (Fälle)	2.2
Reymann	1941	Frauen, Cervix	742	4.48
"	"	Frauen, Urethra	606	2.2
Ilagerman		Frauen, Cervix	20	4
"		Frauen, Urethra*)	20	2.25
"		Frauen, Rectum	6	3
"		Männer, Urethra**)	66	1.34
"		Zusammen	111	1.7

\*) Zwei Fälle mit neg. ausgefallenem Kulturversuch und pos. Direktprobe sind ausgeschlossen. In dem einen Falle waren die Probengläser zu alt und trocken und in der Direktprobe nur wenige Gonokokken, in dem zweiten Falle lag starker, stinkender Fluor mit äusserst starker Mischinfektion vor. Werden diese beiden Fälle mitgezählt, so ist die Quote 1.6.

\*\*) Sieben Fälle mit neg. ausgefallenem Kulturversuch und pos. Direktprobe sind ausgeschlossen worden. Zwei von diesen hatten eine sehr heftige Balanitis mit entzündlicher Phimosis, so dass die Harnröhrenmündung bei der Probenentnahme nicht freigelegt werden konnte. In drei Fällen kamen die Proben erst nach 18 bzw. 20 und 25 Stunden zur Bearbeitung. In zwei Fällen hatte der Patient eben erst eine Sulfathiazolkur durchgemacht, was, wie schon gesagt, den Kulturversuch stören kann. Werden diese sieben Fälle mitgezählt, so ist die Quote 1.15.

Sämtliche Autoren geben an, dass der Kulturversuch bisweilen versagt, wo die Direktprobe einwandfrei Gonokokken zeigt. Die Kultur darf deshalb die Direktprobe nicht verdrängen, vielmehr müssen beide Untersuchungen ausgeführt werden.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, sind die Ergebnisse, wenigstens was die Frauen betrifft, beim Kulturversuch bedeutend besser als bei Direktprobe. In ganz besonderem Masse gilt dies von den Proben aus der Cervix, bei denen die Direktprobe offenbar in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle versagt. Ganz besonders möchte ich auf Reymanns Ergebnisse von 1941 hinweisen, teils weil sein Material das grösste überhaupt ist (1348 positive Proben unter 7340 untersuchten Urethra- und Cervixproben von Frauen), teils weil seine Technik dieselbe ist, mit der in Lund und seit Herbst 1941 auch am Staatlichen Bakteriologischen Laboratorium in Stockholm gearbeitet wird. Von Reymanns 1348 positiven Proben waren 68.6 % nur im Kulturversuch positiv, 3.2 % nur in der Direktprobe und 28.2 % in beiden Verfahren. Von den 742 Cervixproben waren 78 % nur im Kulturversuch positiv, 1.5 % nur in der Direktprobe und 20.5 % in beiden Verfahren. Die Überlegenheit des Kulturversuches als diagnostische Methode tritt also markant zutage.

### *Eigene Ergebnisse der Diagnostik mit Kulturversuchen.*

Unter den Cervixproben habe ich im Kulturversuch 4mal so oft positive Befunde erhoben wie in der direkten Probe, in gutem Einklang mit den Ergebnissen früherer Untersucher. Die niedrigere Quote der Harnröhrenproben, namentlich bei Männern, erklärt sich dadurch, dass Proben für Kulturversuche auch von diagnostisch völlig klaren Gonorrhöefällen eingeschickt worden sind, um Chemoresistenzbestimmungen zu ermöglichen (siehe unten). In denjenigen Fällen, in denen der Kulturversuch zur Sicherung der Diagnose benötigt wurde, hat er indessen wertvolle Dienste getan. Einige Beispiele mögen dies beleuchten.

Fall 1. Eine von 6 verschiedenen Männern als Ansteckungsquelle angegebene Frau wurde sowohl in der gynäkologischen als in der venereologischen Klinik mittels Direktproben untersucht. Verschiedene Urethraproben waren verdächtig, doch fand man nichts, was mit Bestimmtheit als Gonokokken angesprochen werden konnte. In der Cervixprobe war dagegen nichts Verdächtiges festzustellen. Im Kulturversuch zeigten Proben aus Urethra und Cervix starkes Gonokokkenwachstum.

Fall 2. Eine Frau litt seit sehr langer Zeit unter Fluor und seit einigen Wochen auch unter Jucken um die Vulva. Die Direktproben waren negativ, weshalb man einen banalen Fluor annahm. Der Kulturversuch wies jedoch Gonokokken sowohl in der Urethra als in der Cervix nach.

Fall 3. Bei einer als Ansteckungsquelle angegebenen Frau waren sämtliche Direktproben negativ. Nachdem durch Kulturversuch Gonokokken sowohl in der Urethra als in der Cervix festgestellt worden waren, wurde sie zu einer neuen Untersuchung bestellt. Trotzdem man jetzt von dem positiven Gonokokkenbefund im Kulturversuch wusste, erwies es sich nach wie vor als unmöglich, sie in den Direktproben festzustellen. Der Kulturversuch erhob wiederum positive Befunde.

Wie die obigen Fälle zeigen, ist der Kulturversuch für die Diagnose latenter Cervixgonorrhöe sehr wertvoll. Um festzustellen, welchen Wert der Kulturversuch bei einer gynäkologischen Klientel haben kann, ist kürzlich eine Untersuchung in Zusammenarbeit mit der Malmöer Frauenklinik (Chefarzt: Dozent S. Genell) in Angriff genommen worden. An Frauen, bei denen das klinische Bild eine Gonorrhöe möglich oder wahrscheinlich macht, ohne dass jedoch die Direktproben positive Befunde erheben, werden Proben zum Kulturversuch entnommen. Es handelt sich hauptsächlich um Fälle mit Salpingitis-symptomen. Bisher hat in 5 von 10 untersuchten Fällen eine Gonorrhöe festgestellt werden können.

### *Kulturversuche mit Rektumproben.*

Keiner der zahlreichen Autoren, die in den letzten Jahren Gonokokkenkulturversuche studiert haben, von denen oben mehrere zitiert wurden, hat, soweit ich habe sehen können, Ergebnisse über Kulturversuche mit Rektumproben veröffent-

licht. Als die nachstehend geschilderte Untersuchung bereits vollendet war, bin ich indessen auf eine Arbeit von Charlotte Ruys und P. A. Jens, Amsterdam, gestossen, die 1933 (36) veröffentlicht und später in einer Korrespondenz an J. A. M. A. 1935 (37) ergänzt worden ist. Den genannten Autoren ist es mittels Züchtung gelungen, bei 60 % von 82 gonorrhöekranken Frauen sowie bei 38 kleinen Mädchen, die gleichzeitig eine Vulvovaginitis hatten, Rektalgonorrhöe nachzuweisen. Die Quote sämtlicher mittels Kulturen und Direktproben untersuchter Rektumproben beträgt 2,3, somit ein bedeutendes Übergewicht zugunsten des Kulturversuchs.

Man möchte es vielleicht für weniger wahrscheinlich halten, dass es gelingen könnte, Gonokokken, die gegenüber äusseren Einflüssen so empfindlich sind und sich schlechter als die meisten anderen Bakterien züchten lassen, aus einer so überwältigenden Mischung vieler verschiedener, schnell wachsender und wenig wählerischer Bakterien zu isolieren, wie wir sie im Rektum vorfinden. Es erwies sich indessen als möglich, durchaus zufriedenstellende Ergebnisse zu erzielen, und zwar indem die Probe auf Substrate in mehreren Petrischalen verteilt wurde, wodurch sich ein verhältnismässig undichtes Wachstum mit freistehenden Kolonien erzielen liess. Bei der Entnahme der Probe muss man, ebenso wie bei Direktproben aus dem Rektum, versuchen, die Probe aus den Schleimhautfalten zwischen den Columnae rectales zu entnehmen, in denen man das Stäbchen zur Probenentnahme zweckmässig vor dem Herausziehen einmal herumdreht. Auf diese Weise wird das Verhältnis zwischen gonorrhöischem Eiter und Fäkalbakterien nicht ganz so ungünstig, wie es sonst der Fall sein würde.

Es sind insgesamt 45 Rektumproben durch Züchtung untersucht worden. Nur in 2 Fällen waren gleichzeitig entnommene Direktproben positiv, während in 6 Kulturversuchen typische Gonokokken festgestellt wurden.

Im Staatlichen Bakteriologischen Laboratorium zu Stockholm, wo man seit Herbst 1941 Rektumproben nach denselben Prinzipien im Kulturversuch analysiert, hat man in den er-

sten zwei Monaten im Kulturversuch mit 8 Rektumproben positive Befunde erhoben. Auch der Kulturversuch mit Rektumproben kann also diagnostische Bedeutung haben und ist wenigstens in den Fällen durchzuführen, in denen man in der Direktprobe aus dem Rektum Leukocyten, aber keine Gonokokken hat nachweisen können.

Ausser den in der Tabelle angeführten Fällen sind verschiedene Proben an kleinen Mädchen entnommen worden. 2 Urethra- und 2 Vaginalproben lieferten sowohl im Kulturversuch als in der Direktprobe positive Ergebnisse, während bei einer Vaginalprobe nur im Kulturversuch Gonokokken festgestellt wurden.

### *Der Wert der Gonokokkenkultur für die Kontrolle der Heilung nach Chemotherapie.*

Die Gonokokkenzüchtung hat sich somit als wertvolle Hilfsmethode bei der Diagnose der Gonorrhöe erwiesen. Auch bei der Kontrolle der Heilung einer chemotherapeutisch behandelten Gonorrhöe kann der Kulturversuch sehr wertvoll sein. — — — Es hat sich nämlich gezeigt, dass die Gonokokken bei chemotherapeutischer Behandlung zwar in der Regel bald aus den Direktproben verschwinden, gleichzeitig mit dem Abklingen aller klinischen Erscheinungen, dass aber der Kranke in vielen Fällen keineswegs geheilt ist, sondern sich in einem sog. subklinischen oder latenten Stadium befindet. Der Patient hält sich selbst für geheilt und lässt alle Vorsicht ausser acht, und für den kontrollierenden Arzt liegt es nahe, nach einigen negativen Direktproben den Patienten gesundzuschreiben.

Solche Patienten haben eine durch die Chemotherapie modifizierte, latente Gonorrhöe und können dann lange Zeit bei völliger Symptomenfreiheit Ansteckungsquellen bilden. Provokation, z. B. in Form von Beischlaf oder intraurethralen Eingriffen, bewirkt nicht, wie nach örtlicher Behandlung, ein Wiederaufflammen des Prozesses, und die Diagnose lässt sich in vielen Fällen nur mittels des Kulturverfahrens stellen. Uhle

und Mitarbeiter (43) geben sogar an, dass ein solcher Gonokokkenstamm nach Übertragung auf eine andere Person auch diese zum Ansteckungsträger mit Gonorrhöe in latenter, völlig symptomfreier Form machen könne.

Nach Van Slyke u. a. (44) soll es zu dieser symptomfreien latenten Gonorrhöe vor allem nach Behandlung mit Sulfanilamid in zu schwachen Dosen oder in einem frühen Stadium der Krankheit, in welchem das Sulfanilamid weniger wirksam zu sein scheint, kommen. Nach Uhle u. a. (43) sieht man diese Fälle etwa gleich oft nach misslungener Behandlung mit Sulfapyridin und Sulfathiazol. Sommer und Rütther (41) haben derartige Scheinheilungen nach Ulironbehandlung beschrieben. Amerikanische Autoren sprechen in diesen Fällen von einem »carrier state« und betrachten dies als eines der ernstesten Probleme im Gefolge der Chemotherapie.

In Europa hat man statt dessen von »späten Rezidiven« gesprochen. Es hat sich nämlich gezeigt, dass die Rezidive nach erfolgloser Chemotherapie sich nicht, wie es bei der alten örtlichen Behandlung der Fall war, mit zunehmendem Fluor und Gonokokken in den Direktproben wenige Tage nach Abschluss der Behandlung einstellten. Vielmehr dauert es heute in der Regel recht viele Tage, bevor wieder positive Proben vorkommen. Vor allem gilt dies, wenn man nur mit Direktproben arbeitet, oft aber auch bei Züchtung. So fanden Löhe und Brett (23) bei Kontrolle durch Kulturversuche ihre Rezidive in der Regel erst am 5.—7. Tage, in einem Falle erst 21 Tage nach Abschluss der Behandlung. Schmith und Reymann (39) sahen in einem ihrer Fälle erst nach 5 negativen Direktproben im Laufe von 20 Tagen das Rezidiv. Diesen Befund erhoben sie also, wenn sie sich ausschliesslich auf die Direktproben verliessen. Gleichzeitig ausgeführte Kulturversuche mit Proben von demselben Patienten fielen indessen nur einmal negativ aus. Philipp (32) weist auf das Vorkommen sehr später Rezidive bei Adnexgonorrhöe hin und hält Kontrolle durch Kulturversuche für notwendig, damit diese Rezidive nicht übersehen werden.

Lomholt (22) macht auf die grosse Gefahr aufmerksam,



die darin liegt, dass die Gonorrhöe heute in weit grösserem Ausmass von Nicht-Fachärzten behandelt wird, als es früher der Fall war. In vielen Fällen ist die Einstellung dieser nicht fachärztlich geschulten Mediziner zur Zuverlässigkeit der Direktprobe für die Nachkontrolle reichlich optimistisch, so dass sie geneigt sind, ihre Patienten nach relativ kurzfristiger Kontrolle gesundzuschreiben. Es kann dann leicht geschehen, dass verschiedene unter diesen gesundgeschriebenen Patienten noch latente Gonokokkenträger sind. Lomholt hält diese ungenügende Kontrolle und die allzu »vorsichtige« Dosierung der Chemotherapie seitens nicht fachärztlich geschulter Praktiker mit für die wichtigsten Ursachen dessen, dass die Gonorrhöe trotz der Chemotherapie in Dänemark keinen nennenswerten Rückgang aufweist. (Tatsächlich hat die weibliche Gonorrhöe in den letzten Jahren sowohl in Dänemark — Lomholt (22) — als in Schweden — Gerda Kjellberg (19) — zugenommen. Nach Willners (46) ist in Schweden eine Zunahme der Gonorrhöe von 1940 bis 1941 um 6 % zu verzeichnen.) Lomholt steht ferner auf dem Standpunkt, dass die Untersuchung durch Kulturversuche binnen kurzem am allen venerologischen Kliniken als Routinemethode eingeführt werden müsse, wenigstens für 2 Patientengruppen. Erstens für die als Ansteckungsquellen angezeigten Frauen. Drei Kulturversuche hält er hier für das Mindestmass. Zweitens für alle Frauen, die gesundgeschrieben werden sollen, namentlich nach chemotherapeutischer Behandlung. Hier hält er zwei Kulturversuche für ausreichend.

Reymann hat in seiner kürzlich erschienen Dissertation (35) den Wert des Kulturversuchs zur Kontrolle der Heilung bei Frauen untersucht. Er fand u. a., dass nach der örtlichen Behandlung die »Rezidive« mittels Kulturversuchen 4.7mal so oft wie mit Direktproben diagnostiziert wurden. Nach Sulfanilamid- bzw. Sulfapyridinbehandlung waren die entsprechenden Zahlen 2.6 und 1.7. (Die Quoten sind hier berechnet worden, um Vergleiche mit früher mitgeteilten Zahlen zu ermöglichen.) Unter 166 mit Sulfanilamid behandelten Frauen konnte Reymann bei 24 (=14.5 %) Rezidive nur durch Kul-

turversuch feststellen, bei 15 (= 9 %) auch durch Direktprobe. Bei einer mit Sulfanilamid behandelten und nur durch Direktproben kontrollierten Klientel dürfte also damit zu rechnen sein, dass nicht ganz wenige chemoresistente Fälle gesundgeschrieben werden.

In Schweden ist die Gefahr später Rezidive nach Chemotherapie u. a. von Strandberg (42) und Herlitz (15) unterstrichen worden. Herlitz sah Rezidive durchschnittlich 11 Tage nach abgeschlossener Sulfathiazolbehandlung, in einigen Fällen erst nach zwei Wochen. Falk (7) sah Rezidive nach Behandlung mit Sulfanilamid und Sulfapyridin bei Männern noch Ende der 3. Woche (6. Kontrolle), bei Frauen in der 6. Woche (12. Kontrolle). Bei den schwedischen Untersuchungen sind nur Direktproben verwandt worden. — Angesichts dieser Umstände ist man am Krankenhaus St. Göran in Stockholm dazu übergegangen, für Männer mindestens 6, für Frauen mindestens 10—12 negative Kontrollen (Direktproben in Abständen von einigen Tagen) zu fordern.

In meinem eigenen Material haben Rezidive durch Kulturversuch (bei gleichzeitig negativer Direktprobe) in 8 Proben von 7 Männern festgestellt werden können, in einem Falle erst am 10. Tage nach abgeschlossener Chemotherapie. In einem weiteren Falle hatte der Patient, ein Mann mit frischer Gonorrhöe, wegen Fluor am Vorabend des Untersuchungstages eine einzige Tablette Sulfapyridin (0.5 g) eingenommen. Die Direktprobe war negativ, der Kulturversuch positiv.

Dies beleuchtet eine Tatsache, auf die u. a. Strandberg (42) hingewiesen hat, nämlich dass manche Leute auf eigene Faust zu Sulfanilamidpräparaten greifen, wenn sie glauben, mit Gonorrhöe angesteckt worden zu sein oder wenn sie »prophylaktische Behandlung« nötig zu haben meinen. Es ist klar, dass in solchen Fällen eine Gonorrhöe übersehen werden kann. Durch Einnehmen von Sulfanilamidpräparaten vor den Kontrolluntersuchungen kann auch eine Person mit nicht ausgeheilter Gonorrhöe vorübergehend die Gonokokken aus den Direktproben verschwinden lassen, um auf diese Weise gesundgeschrieben zu werden. So teilen u. a. Périn und Marcéron

(31) mit, dass Prostituierte dies jetzt verschiedentlich vor den regelmässigen Kontrolluntersuchungen täten.

In solchen Fällen kann der Kulturversuch bisweilen den wahren Sachverhalt aufdecken. Doch ist in diesem Zusammenhang zu unterstreichen, dass man sich nicht auf negativ ausgefallene Kulturversuche gleich nach abgeschlossener Chemotherapie verlassen darf. Es hat sich nämlich gezeigt, auch in meinem Material, dass die Wachstumskraft der Gonokokken unter dem Einfluss von Sulfanilamiden für einige Tage so geschwächt werden kann, dass sie beim Kulturversuch nicht auswachsen, selbst wenn die Direktproben einwandfrei Gonokokken zeigen.

### *Die Bedeutung der Chemoresistenz für das Ergebnis der Therapie.*

Seit der Einführung der Sulfanilamide in die Gonorrhöetherapie hat man feststellen können, dass gewisse Fälle gegenüber diesen Präparaten resistent sind. In der letzten Zeit beginnt man auch zur Klarheit über die Ursachen dieser Resistenz zu kommen.

Nach Felkes (9) und besonders Schmith u. Reymanns (39) Untersuchungen liegt das therapeutische Versagen vor allem darin begründet, dass gewisse Gonokokkenstämme sehr resistent gegen Sulfonamide sind. Diese sog. Chemoresistenz tritt sowohl in vivo bei Behandlung von Gonorrhöe mit verschiedenen Sulfonamiden als in vitro bei Züchtung von Gonokokken auf Nährböden, die diese Präparate enthalten, in Erscheinung.

Schmith und Reymann (39) züchteten Gonokokken auf Aszitesagar mit Zusatz von Sulfapyridin in 9 verschiedenen Konzentrationen, 0—8, wobei 0 die höchste und 8 die schwächste Konzentration angibt. Sie bezeichneten die Empfindlichkeit eines Gonokokkenstammes mit der Zahl der höchsten Konzentration, bei der die Gonokokken wachsen konnten, so dass also die resistentesten Stämme die niedrigsten Zahlen bekamen. — Die Übereinstimmung zwischen den klini-

schen Behandlungsergebnissen bei Gonorrhöe und der Resistenziffer der entsprechenden Gonokokkenstämme war sehr gut. Die Patienten, die sich als gegen Chemotherapie resistent erwiesen, waren regelmässig mit Stämmen mit niedriger Ziffer infiziert, also solchen Stämmen, die auch in starken Sulfapyridinkonzentrationen wachsen konnten. Nach Bestimmung der Chemoresistenz war also nach Schmith und Reymann mit grosser Sicherheit vorauszusagen, wie das Ergebnis der Chemotherapie im einzelnen Gonorrhöefall sein würde.

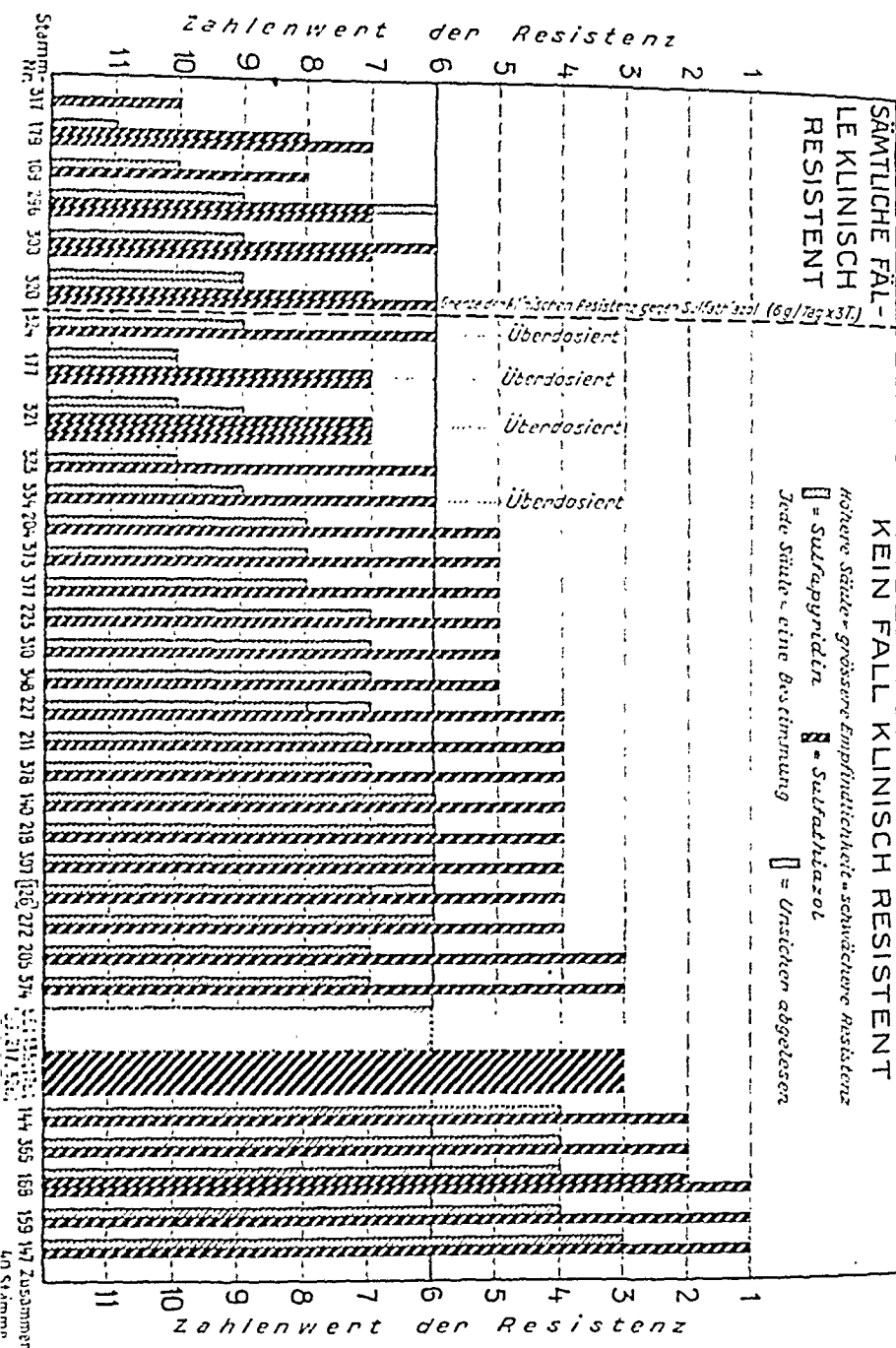
Ferner konnte gezeigt werden, dass die Chemoresistenz eines Gonokokkenstammes bei Übertragung auf eine andere Person etwa unverändert blieb, worüber auch von anderer Seite klinische Erfahrungen vorliegen.

Miescher und Schnetz (27), die ebenfalls Untersuchungen über die Chemoresistenz in vitro gemacht haben, sind der Ansicht, dass die unterschiedliche Chemoresistenz der Gonokokkenstämme keine so grosse Rolle für das Ergebnis der Chemotherapie spiele. Gestützt auf eigene Untersuchungen, legen sie dar, dass die wechselnde antibakterielle Wirkung der Seren der Patienten die grösste Rolle für die individuelle Prognose bei chemotherapeutisch behandelter Gonorrhöe spiele.

Kimmig und Vonkennel (18) geben an, in vitro keine chemoresistenten Gonokokkenstämme gefunden zu haben, auch nicht bei Patienten, die sich als klinisch resistent gegenüber verschiedenen Sulfonamiden erwiesen hatten.

Wie man sieht, gehen die Meinungen über das Vorkommen und die etwaige Bedeutung der Resistenz von Gonokokken immer noch auseinander. Um einen weiteren Beitrag zur Frage nach der prognostischen Bedeutung der Chemoresistenz bei Gonorrhöe zu liefern, habe ich mit einer eigenen, früher vorgelegten Methodik (12) die Chemoresistenz in vitro gegenüber Sulfapyridin und Sulfathiazol an 40 Gonokokkenstämmen von 38 Patienten der Lunder Venercologischen Klinik und Poliklinik untersucht.

Auf eine Serie Schokoladeplatten (nach McLeod-Reymann) werden Sulfathiazollösungen von verschiedener Konzentration getrü-



Chemoresistenzbestimmungen in vitro an 40 Gonokokkenstämmen von 38 Patienten, verglichen mit dem klinischen Behandlungserfolg.  
 (Zugleich ein Vergleich zwischen der Wirkung von Sulfathiazol und von Sulfapyridin in vitro gegenüber Gonokokken.)

Das linke Feld des Diagramms umfasst Gonokokkenstämmen derjenigen Patienten, die sich als klinisch resistent gegen Sulfathiazol in der Dosis 6 g/Tag während einer Zeit von 3 Tagen oder länger erwiesen haben. Das rechte Feld umfasst sämtliche Stämme, die gegen dieselbe Behandlung nicht klinisch resistent waren (Nr. 126 macht eine Ausnahme, siehe den Text). In beiden Fällen sind die Stämme von links nach rechts nach abnehmender Resistenz = ansteigender Empfindlichkeit geordnet. Die Stämme 296–300 sind von einem und demselben Patienten vor und nach erfolgloser Sulfathiazolbehandlung, 10 g/Tag während 3 Tagen. Die Stämme 320–324 stammen ebenfalls von einem und demselben Patienten vor und nach erfolgloser Sulfathiazolbehandlung, 6 g/Tag während 3 Tagen. Gegenüber Stamm 324 erwies sich die Dosis 12 g/Tag an 3 Tagen als wirksam, weshalb dieser Stamm im rechten Feld untergebracht ist.

felt, und zwar 1:200, 1:400, 1:800, — — — 1:204800 (geometrische Verdünnungsserie). Auf jede Hälfte jeder Platte wird je ein Tropfen geträufelt. Nachdem die Tropfen völlig eingesogen sind (nach 2—5 Stdn. bei 18° C), wird eine kleine und möglichst konstante Menge Gonokokken so gleichmässig wie möglich über die Oberfläche der Platten verstrichen. Nachdem die Platten 24 Stunden lang bei 36,5° C in Zuchtungsgefässen gestanden haben, sieht man den Tropfen entsprechend runde »Hemmungszonen«, unbewachsene Flächen inmitten des übrigen reichen Gonokokkenwachstums. Der Durchmesser nimmt mit der fallenden Sulfathiazolkonzentration der betreffenden Tropfen recht gleichmässig ab, was eine gute Kontrolle dafür bietet, dass keine gröberen methodischen Fehler begangen worden sind. Als Ausdruck der Chemoresistenz des Gonokokkenstammes gilt die Konzentration der schwächsten Sulfathiazollösung, von der ein Tropfen eine deutliche Hemmungszone hervorzurufen vermocht hat. Die Resistenz gegenüber Sulfathiazol (bzw. Sulfapyridin) wird durch die Zahlen 1—11 ausgedrückt, wobei 11 die höchste Tropfenkonzentration, 1:200, und 1 die schwächste, 1:204800, bezeichnet. Jedes Intervall, z. B. 3—4, bedeutet eine Verdoppelung der vorigen Konzentration. 10 bezeichnet eine 512mal stärkere Konzentration (und somit Resistenz) als 1. Bei orientierenden Bestimmungen für den praktischen Gebrauch genügen Tropfenkonzentrationen entsprechend den Resistenzwerten 8, 7, 6, 5, 4 und 2, wozu 3 Platten benötigt werden.

Einen Vergleich zwischen den mit dieser Technik ermittelten Resistenzwerten und dem klinischen Erfolg der angewandten Chemotherapie veranschaulicht das beigegefügte Diagramm.

Die in der vorliegenden Untersuchung erhaltenen Resistenzwerte dürften als ziemlich signifikant gelten können, da sämtliche Stämme durch gleichzeitige Doppelbestimmungen gegen Sulfapyridin und Sulfathiazol, bisweilen zu wiederholten Malen, untersucht worden sind. Da der Unterschied hinsichtlich der Wirkung zwischen den beiden Präparaten sehr konstant ist (siehe das Diagramm und S. 522), hat man dadurch eine gute Kontrolle für die Richtigkeit der Bestimmungen.

Unter den klinisch chemoresistenten Stämmen befinden sich drei mit dem Sulfathiazolwert 8 und höher. Unter den klinisch nicht resistenten Stämmen findet sich keiner mit so

hohen Werten. — An zweiter Stelle stehen drei Stämme mit den Werten 7—6. Unter den nicht resistenten haben fünf Stämme diese Werte. Beide Fälle mit dem Werte 7 sind indessen mit grösseren Sulfathiazoldosen als üblich behandelt worden, was vielleicht erklärt, dass sie sich klinisch nicht als resistent erwiesen haben. — Alle Stämme mit den Werten 5 und tiefer haben sich klinisch nicht resistent gezeigt, mit einer einzigen Ausnahme, nämlich Stamm 126, der gegen die übliche Dosis Sulfathiazol klinisch resistent war. Die Resistenzbestimmung, die für Sulfathiazol den Wert 4 gab, wurde indessen erst 4 Wochen nach Reinzüchtung des Stammes vorgenommen. Da es sich später gezeigt hat, dass der Resistenzwert in manchen Fällen *in vitro* recht bald abnehmen kann, liegt in diesem abweichenden Werte nichts Merkwürdiges. Da der fragliche Stamm zu der vergleichenden Untersuchung Sulfathiazol — Sulfapyridin gehört, habe ich ihn in das Diagramm aufgenommen.

Die Grenze der klinischen Resistenz gegen Sulfathiazol in der Dosis 6 g/Tag 3 Tage lang scheint also in diesem Material bei dem Werte 6 zu liegen. (Später sind weitere 40 klinisch chemoresistente Fälle hinzugekommen, bei denen die Resistenz zwischen 10 und 6 lag. In einem weiteren Falle, in dem der Patient ein »Spätrezidiv« mit einem wenig resistenten Stamm nach Chemotherapie bekam, konnte eine Reinfektion nachgewiesen werden.)

Die Übereinstimmung zwischen den experimentellen und den klinischen Ergebnissen ist somit sehr gut. Ebenso wie Schmith u. Reymann (39), habe ich mit recht grosser Sicherheit die Chemoresistenzbestimmungen in den einzelnen Gonorrhöefällen prognostisch auswerten können. Bei Patienten mit dem Sulfathiazolwert 4 und niedriger bestehen sehr gute Aussichten, dass sie durch Sulfathiazolbehandlung in der eben genannten Dosis geheilt werden. Patienten, deren Stämme Resistenzwerte von 8 und höher haben, werden aller Wahrscheinlichkeit nach Rezidive bekommen, wenn die Gonokokken überhaupt aus den Direktproben verschwinden. Was die Grenzfälle, mit den Werten 7—6 und in gewissem Ausmass 5,

betrifft, kann man den Klinikern den Bescheid geben, dass das Risiko eines Versagens gross ist, weshalb die betreffenden Patienten lange unter Kontrolle bleiben müssen. (In mehreren Fällen sind bei Patienten mit dem Resistenzwert 7 oder 6 die Rezidive auffallend lange Zeit nach abgeschlossener Chemotherapie aufgetreten.)

Auf diese Weise vermag der Bakteriologe auch gewisse Richtlinien für die Behandlung zu schenken. (In den recht zahlreichen Fällen, in denen die Diagnose durch Kulturversuch gestellt worden ist, kann die Chemoresistenzbestimmung oft gleichzeitig mit dem endgültigen Züchtungsbefund vorliegen, so dass sich die Behandlung von vornherein nach dem Resistenzwert richten kann.) Der Patient mit einem resistenten Stamme bekommt sofort, ohne dass man erst ein etwaiges Rezidiv abwartet, eine bedeutend grössere Dosis als üblich (siehe hierüber S. 527), und er wird, auch wenn die Direktproben negativ sein sollten, längere Zeit durch wiederholte Kulturversuche kontrolliert. — Besonders wenn man mittels Kulturversuchen kontrolliert, dürfte dagegen die Observation in den meisten (nicht resistenten) Fällen stark abgekürzt werden können, was für im Krankenhaus liegende Patienten, besonders Frauen, wirtschaftlich sehr wesentlich ist. Die Unkosten für Züchtung und Chemoresistenzbestimmung dürften sich bei den betreffenden Patienten im Hinblick auf die damit zu erzielende Abkürzung des Krankenhausaufenthaltes sehr wohl lohnen.

#### *Andere für das Ergebnis der Chemotherapie bedeutsame Faktoren.*

Unsere heutige Einsicht in die Bedeutung der Immunität bei Gonokokkeninfektionen ist sehr lückenhaft. Indessen waren Miescher und Schnetz (27) der Ansicht, es liege eine wechselnde antibakterielle Wirkung der Seren der verschiedenen Patienten vor, und diese sei der entscheidende Faktor für die Prognose bei der chemotherapeutisch behandelten Gonorrhöe. Sowohl Schmith und Reymanns als meine eigenen oben vor-



gelegten Erfahrungen sprechen jedoch entschieden gegen die Richtigkeit dieser Ansicht.

Andererseits scheinen immunisatorische Vorgänge bisweilen eine gewisse Rolle spielen zu können. Hierfür spricht u. a. der Umstand, dass die Sulfanilamidbehandlung der Gonorrhöe viel besser wirkt, wenn diese einige Wochen alt ist, als wenn es sich um eine ganz frische Infektion handelt. Ferner ist die Heilungszahl, einerlei, welches Mittel man anwendet, prozentual in der Regel bei Frauen höher als bei Männern, was zum Teil daran liegen kann, dass die Gonorrhöe der Frau in der Regel länger unentdeckt bleiben dürfte als die des Mannes. In meinem (im Diagramm dargestellten) Material betreffen sämtliche chemoresistenten Fälle Männer, also im Einklang mit der früheren Erfahrung. Doch kann es sich, da das Material nur klein ist, um einen Zufall handeln.

Ein anderer Faktor, der bisweilen für die Prognose von Bedeutung sein kann, ist der Gehalt des verabfolgten Sulfonamidderivates im Blute. Man weiss, dass vom Darm aus Sulfonamidpräparate bei verschiedenen Menschen etwas verschieden stark resorbiert werden, und dass die Azetylierung, durch die das Präparat in eine unwirksame Form gebracht wird, mehr oder weniger stark sein kann. Es ist also denkbar, dass die Chemotherapie erfolglos bleibt, wenn der fragliche Gonokokkenstamm noch gerade genügend empfindlich ist, um von dem angewandten Sulfonamidpräparat beeinflusst zu werden, der betreffende Patient das Mittel aber schlechter resorbiert als gewöhnlich. Die Schwankungen des Resorptionsvermögens erreichen jedoch bei weitem nicht dieselbe Grössenordnung wie die Schwankungen der Gonokokkenresistenz, die Unterschiede bis zum Verhältnis 1 : 500 aufweisen können (siehe das Diagramm). Unterschiede der Resorption können daher kaum entscheidende Bedeutung für das Behandlungsergebnis haben.

In manchen Fällen kann, worauf u. a. Haxthausen (14) aufmerksam gemacht hat, ein klinisches Versagen der Chemotherapie möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass die Gonokokken noch in einem abgekapselten, meist eitergefüll-

ten Herde verbleiben, z. B. periurethral oder in der Prostata. Man weiss, u. a. durch Untersuchungen von Colin MacLeod (25) sowie Lockwood und Lynch (21), dass Eiter Substanzen enthält, die die Wirkung der Sulfonamide hemmen. Es ist dann durchaus verständlich, dass die Gonokokken in einem solchen Herde fortleben können, da sie darin der Wirkung des Sulfonamids entzogen sind.

*Gibt es eine Gefahr einer Zunahme der Anzahl chemoresistenter Stämme?*

Ein Problem, das in der letzten Zeit in der Chemotherapie in den Vordergrund getreten ist, ist die sog. Chemoresistenz-erhöhung. Darunter versteht man das Vermögen eines Bakterienstammes, seine Resistenz gegen Sulfonamide zu erhöhen, wenn er in einem Milieu wächst, das ein Sulfonamidpräparat in passender Konzentration enthält. — — — Chemoresistenz-erhöhung kann sowohl in vitro als im lebenden Organismus eintreten. Schmith und Reymann (39) haben in ein paar Fällen während der Behandlung von Gonorrhöe eine Erhöhung der Chemoresistenz nachweisen können. Andererseits haben sie durch Untersuchung von Gonokokkenstämmen aus der Zeit vor Einführung der Chemotherapie zeigen können, dass es auch primär hochresistente Stämme gibt, weshalb das Auftreten der chemoresistenten Stämme wenigstens nicht ausschliesslich auf eine durch ungenügende Chemotherapie hervorgerufene Resistenz-erhöhung zurückgeführt werden kann. Sie haben ferner (38) und (40) die sehr wichtige Feststellung gemacht, dass eine Resistenz-erhöhung, die unter dem Einfluss eines gewissen Sulfonamidpräparats eingetreten ist, gleichzeitig auch eine entsprechende Erhöhung der Resistenz gegenüber anderen derartigen Präparaten mit sich bringt.

In zwei Fällen meines Materials hat eine Resistenz-erhöhung festgestellt werden können:

Fall 4. Ein Mann bekam 4 Tage lang täglich  $0.5 \text{ g} \times 5$  Sulfapyridin. Während dieser Zeit erhöhte sich die Resistenz des Gonokokkenstammes in vitro etwa auf das 16fache, so dass der Patient sich

dann auch als gegen Sulfathiazol resistent erwies. Die Resistenzzahlen beider Präparate stiegen etwa gleichmässig stark.

Fall 5. Ein Mann, der früher erfolglos mit Sulfapyridin behandelt worden war, bekam dann 3 Tage lang 1 g  $\times$  6 Sulfathiazol. Es konnte dabei eine Resistenzserhöhung auf das 4- evtl. 8fache festgestellt werden.

In ein paar anderen Fällen, in denen die Resistenz vor und nach einer missglückten Sulfathiazolkur bestimmt worden war, war keine weitere Erhöhung der von vornherein recht starken Resistenz zu verzeichnen.

In meinem Material sind sämtliche Fälle mit stärkerer Resistenz, in dem Diagramm von links bis 177, früher mit Sulfapyridin und in ein paar Fällen vorher noch mit Sulfanilamid behandelt worden. Es mag vielleicht ein Zufall sein, doch erscheint es etwas eigentümlich, dass kein primär sulfathiazolresistenter Fall darunter ist. Der Verdacht lässt sich nicht ganz von der Hand weisen, dass die vorherige Sulfapyridinbehandlung wenigstens in einigen dieser Fälle zu der hohen Resistenz und dem therapeutischen Misserfolg beigetragen hat.

In einer Anzahl von Fällen habe ich die spontanen Schwankungen der Chemoresistenz von längere Zeit gezüchteten Gonokokken verfolgt. In sämtlichen Fällen verliefen die Schwankungen in bezug auf Sulfapyridin und Sulfathiazol parallel.

Offenbar kann also eine nicht genügend effektive Behandlung mit einem Sulfonamidpräparat in gewissen Fällen die Resistenz eines Gonokokkenstammes so steigern, dass der Stamm nicht mehr durch Chemotherapie beeinflusst wird, welches Mittel man auch versuchen mag. Durch Behandlung der Gonorrhöe mit Sulfonamidpräparaten in ungenügenden Dosen sowie durch Versuche zur Selbstbehandlung oder »Prophylaxe« von seiten der Patienten kann zweifellos auch eine Zunahme der Anzahl chemoresistenter Stämme bewirkt werden. Dies unterstreicht abermals die Wichtigkeit dessen, dass die Ärzte bei der Behandlung der Gonorrhöe die Erfahrungen der letzten Jahre auf diesem Gebiet berücksichtigen. Behand-

lung und Kontrolle der Gonorrhöe sind in möglichst grossem Ausmass Sache des Facharztes.

Ausser durch Chemoresistenzerhöhung kann eine bedeutende Zunahme der Anzahl chemoresistenter Stämme auf andere Weise eintreten. Wenn nämlich die chemoresistenten Fälle von Gonorrhöe nicht genügend kontrolliert werden, am besten durch Kulturversuche, so besteht zweifellos, wie schon hervorgehoben, die Gefahr, dass wenigstens ein Teil der betreffenden Patienten als unentdeckte, symptomfreie Ansteckungsquellen umhergehen werden. Jede Person, die mit ihren resistenten Stämmen angesteckt wird, läuft ebenfalls Gefahr, bei Behandlung in gleicher Weise anscheinend gesund zu werden, in Wirklichkeit aber Gonokokkenträger zu bleiben. Auf diese Weise können einige wenige chemoresistente Stämme binnen ziemlich kurzer Zeit zu einer relativ grossen Anzahl chemoresistenter Gonorrhöefälle führen.

Auf diesen beiden Wegen kann es also zu einer Zunahme der Anzahl chemoresistenter Stämme kommen. Lomholt (22) wies schon 1940 darauf hin, dass die Zahl der chemoresistenten Stämme in Kopenhagen in langsamem Steigen begriffen sei. Seiner Ansicht nach werden diese Stämme mehr und mehr dominieren, und man könne befürchten, dass dadurch unsere heutige Chemotherapie mit der Zeit völlig kompromettiert werde.

Glücklicherweise dürften wir gegenüber den angedeuteten, vielleicht recht grossen Gefahren nicht wehrlos sein. Wir können zwei verschiedene Wege beschreiten, um ihrer Herr zu werden. Einmal die Herstellung immer wirksamerer chemotherapeutischer Mittel und ihre bestmögliche Anwendung. Zweitens sichrere Diagnose und bessere Kontrolle, die ihrerseits in erheblichem Grade auf dem Kulturverfahren fussen müssen.

### *Wahl der Präparate für die Behandlung.*

Die meisten führenden Venercologen scheinen sich einig darin zu sein, dass das Sulfathiazol gegenwärtig dasjenige

Präparat ist, das bei Behandlung der Gonorrhöe die besten Erfolge zeitigt. Zahlreiche Zusammenstellungen klinischer Ergebnisse aus verschiedenen Ländern lassen erkennen, dass Sulfathiazol dem Sulfapyridin klar überlegen und dieses seinerseits erheblich besser als Sulfanilamid ist. Es hat sein bestimmtes Interesse, dass sich dieser Unterschied in der klinischen Wirkung sehr genau bei Versuchen *in vitro* reproduzieren lässt. So haben Schmith und Reymann (40) gezeigt, dass die wachstumshemmende Wirkung des Sulfathiazols *in vitro* gegenüber Gonokokken etwa zehnmal so stark ist wie die des Sulfapyridins, und die des Sulfapyridins etwa neunmal so stark wie die des Sulfanilamids. Miescher und Schnetz (27) fanden eine 4—8mal so starke wachstumshemmende Wirkung des Sulfathiazols wie die des Sulfapyridins und eine 16—64mal so starke wie die des Sulfanilamids und Albucids. Vonkennel und Kimmig (47) haben Versuche mit verschiedenen von Kimmig dargestellten, dem Sulfathiazol verwandten Verbindungen, Thiodiazolen, gemacht, um ihre Wirkung auf Gonokokken zu prüfen. Einige von ihnen erwiesen sich *in vitro* und bei vorbereitenden klinischen Versuchen als von guter Wirkung.

In einer Reihe noch unveröffentlichter Versuche habe ich die Wirkung von einigen dieser letztgenannten Verbindungen *in vitro* u. a. auf Gono- und Pneumokokken sowie Coli untersucht. Die Ergebnisse sind in gewisser Hinsicht günstig, und es ist möglich, dass sich eine dieser Verbindungen auch als klinisch wertvoll erweisen wird.

Bei vergleichender Prüfung der Wirkung von Sulfapyridin und Sulfathiazol *in vitro* an meinen 40 Gonokokkenstämmen (siehe das Diagramm) war die Wirkung mit Sulfathiazol etwa 8mal stärker, einerlei, ob die Prüfung an mehr oder weniger resistenten Stämmen ausgeführt wurde.

Auch die experimentellen Befunde sprechen also zugunsten des Sulfathiazols. Das Sulfapyridin ist teurer, weniger effektiv und stärker toxisch als Sulfathiazol, ausserdem scheint es eine gewisse Gefahr erhöhter Resistenz des Gonokokkenstammes bei misslungener Therapie zu bedeuten. Sul-

fanilamid ist zwar billig, doch weit weniger wirksam als die beiden anderen Mittel. Das Risiko, hiermit symptomfreie Ansteckungsquellen zu schaffen, ist vermutlich recht gross.

Von mehreren Seiten hat man gute Erfolge mit Sulfamethylthiazol gemeldet. Es scheint *in vitro* (nach eigenen unveröffentlichten Untersuchungen) nur wenig schwächer als Sulfathiazol zu sein, wird aber unregelmässig resorbiert und in bedeutend höherem Masse azetyliert als Sulfathiazol. Da die Azetylverbindung ziemlich schwerlöslich ist, ist die Gefahr, dass es zu Konkrementbildung kommt, ziemlich gross. Ferner soll Sulfamethylthiazol toxische Nebenwirkungen, speziell Neuritiden, hervorrufen können. Nach den Untersuchungen Bieters u. a. (2) an Kücken soll die Methylverbindung mehr als Sulfathiazol Schädigungen des Nervensystems hervorrufen. Nach Moeschlin (28) bewirkt es auch öfter hämolytische Anämie. Berglund und Frisk (1) warnen wegen der Giftigkeit des Sulfamethylthiazols vor seiner Verwendung bei Pneumonie.

Bei der Prüfung neuer Chemotherapeutika ist nach Möglichkeit an sämtlichen Gonokokkenstämmen die Chemoresistenz zu bestimmen. Nur dadurch lässt sich die Fehlerquelle vermeiden, die in einer ungleichmässigen Verteilung chemoresistenter Fälle auf Prüfungsgruppe und Kontrollmaterial steckt.

### *Wie soll Sulfathiazol dosiert werden?*

Als geeignete Dosis empfiehlt u. a. Haxthausen (14) 1 g 6mal täglich bei einer Behandlungszeit von 2, evtl. 3 Tagen. Zwar kann man in vielen Fällen mit nur einer oder ein paar grossen Dosen eine Heilung herbeiführen, wie es u. a. Miescher (26), Hamann (13), Bonnevie (3) sowie Hämel und Link (17) versucht haben, indessen scheint die Erfahrung einstweilen doch dafür zu sprechen, dass die Heilungszahlen bei einer etwas längeren Behandlung grösser sind. (Siehe u. a. Haxthausen (14) sowie Hrad und Petrin (16).) In Lund werden seit Ende 1940 3 Tage lang 6 g Sulfathiazol täglich gegeben.

### *Dosierung bei chemoresistenten Fällen.*

In den Fällen, in denen ein erster »Stoss« mit einem Sulfonamidpräparat wirkungslos geblieben ist, oder in denen eine Chemoresistenzbestimmung hohe Werte zeigt, dürfte es sich empfehlen, einen Versuch mit einer bedeutend höheren Dosis zu machen, wie u. a. Haxthausen (14) empfiehlt. Da die Resistenz in vitro so eng mit der Sulfathiazolkonzentration zusammenhängt, erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass eine höhere Blutkonzentration in vitro ebenfalls einen besseren Effekt zeitigen wird. Einer meiner Fälle ist ein praktischer Beweis dafür, dass es sich tatsächlich so verhält.

Fall 6. Ein Mann bekam 3 Tage lang 6 g pro Tag Sulfathiazol. Die Gonokokken verschwanden während der Behandlung aus den Direktproben, waren aber nach ein paar Tagen wieder da. Es wurde sofort ein zweiter Stoss eingeleitet, 12 g pro Tag während 3 Tagen, der zur endgültigen Heilung führte. Der Gonokokkenstamm (320—324) war also gegen Sulfathiazol in der ersten, schwächeren Dosis resistent, dagegen nicht gegen die dann einverleibte, doppelt so grosse.

### *Praktische Folgerungen aus den neuen Erfahrungen.*

1. In jedem Falle, in dem Verdacht auf Gonorrhöe besteht, die Direktprobe aber negativ ausfällt, ist der Kulturversuch auszuführen, namentlich wenn es sich um als Ansteckungsquellen bezeichnete Personen handelt. Frauen ist die Freiheit von Gonokokken nur nach Kontrolle durch Kulturversuch, wie am besten 3mal wiederholt wird, zu bescheinigen.
2. Alle Frauen, bei denen man eine Salpingitis vermutet oder die wegen Fluor zum Arzt kommen, ohne dass eine zufriedenstellende gynäkologische Erklärung der Symptome vorliegt, sind durch Kulturversuch zu untersuchen.
3. Nach beendigter Behandlung weiblicher Gonorrhöe ist die Heilung sehr sorgfältig durch wiederholte Direktproben und mindestens zwei Kulturen zu untersuchen, von denen wenigstens die eine gleich nach der Men-

stration, wo die Aussichten auf einen positiven Befund am grössten sind, auszuführen ist. (Nach gewissen Autoren, u. a. Sommer und Rüther (41), soll die Cervixprobe zur Kultur statt dessen am zweiten Tage der Regel entnommen werden.)

4. Bei Männern ist die Kontrolle durch Kulturversuch erwünscht. Kann sie nicht durchgeführt werden, so ist die Heilung nach abgeschlossener Therapie sehr sorgfältig durch wiederholte Direktproben zu kontrollieren. Bei einem etwaigen Rezidiv ist nach Möglichkeit nach der neuen Kur Kontrolle durch Kultur vorzunehmen.
5. Bei der Behandlung ist nach der heutigen Erfahrung Sulfathiazol zu verwenden, zweckmässig in der Dosis  $1\text{ g } 6 \times$  tägl. 2—3 Tage lang. Bei Rezidiven ist sofort ein neuer Behandlungsschoss mit bedeutend höherer Dosis einzuleiten.
6. Neue Präparate sollen nur bei gleichzeitiger Bestimmung der Chemoresistenz der Gonokokkenstämme der betreffenden Patienten geprüft werden, da die Resistenz, wie schon hervorgehoben, stark schwanken kann.
7. Wo die Möglichkeit dazu vorhanden ist, empfiehlt sich die Chemoresistenzbestimmung bei allen Fällen, die sich bei der ersten Kur mit Chemotherapie als resistent erwiesen haben. Sollte sich der fragliche Gonokokkenstamm dabei als wenig resistent erweisen, so ist nach abgekapselten Herden, z. B. periurethral gelegenen, zu suchen und die entsprechende Behandlung durchzuführen, ferner ist die Möglichkeit der Reinfektion zu erwägen. Falls möglich, wird bei einer neuen Kur untersucht, wie hoch der Sulfathiazolgehalt des Blutes ansteigt, um so zu kontrollieren, dass die Resorption in normalem Umfang vor sich geht. Sollte dies nicht der Fall sein, so wird vielleicht eine parenterale Einverleibung zum Ziele führen.
8. Das Ideal wäre, bei jedem Falle von Gonorrhöe einen Kulturversuch mit anschliessender Chemoresistenzbestimmung vorzunehmen. Man würde dann frühzeitig



wissen, wie sich die Prognose im Einzelfalle ausnimmt, und könnte die Behandlung und Kontrolle danach einrichten. In den Fällen, bei denen die Diagnose allein durch Kultur gestellt wird, kann die Chemoresistenzbestimmung in der Regel gleichzeitig mit der Kulturanalyse fertig sein. Es ist dann möglich, die Behandlung sofort nach der Resistenz anzupassen. Am besten wäre es vermutlich, stets eine solche »primäre Resistenzbestimmung« mit verzögerter, individualisierter Behandlung durchzuführen.

Durch die primär ausgeführte Resistenzbestimmung gewinnt man ferner die Möglichkeit, schon von Anfang an und bis zur endgültigen Heilung die Träger der tückischen resistenten Gonokokkenstämme zu isolieren. Selbstverständlich ist mit grösster Energie danach zu streben, dass die Ansteckungsquellen dieser Patienten mit chemoresistenter Gonokokken entdeckt und unter Kontrolle gebracht werden.

Bei Beachtung der oben aufgezählten Punkte dürfte es wahrscheinlich möglich sein, die Gonorrhöe als Volksübel wirksamer zu bekämpfen, als es jetzt der Fall sein dürfte.

### *Zusammenfassung.*

Die Gonokokkenkultur hat erst in den letzten Jahren und namentlich seit Erscheinen der Arbeiten McLeods und seiner Mitarbeiter sowie Neumanns praktische Bedeutung erlangt. Durch die von Reyman eingeführten Röhren für den Probenversand, in denen sich die Proben bis zu 12 Stunden und oft noch länger halten, ist die Gonokokkenkultur als diagnostische Methode in die Reichweite der meisten Ärzte gerückt.

Die grosse Überlegenheit der Kultur gegenüber der mikroskopischen Untersuchung von Ausstrichpräparaten bei der Diagnose der Gonorrhöe, besonders bei Frauen, ist durch die Arbeiten der letzten Jahre, auch die des Verf.s, klar erwiesen.

Auch bei Kulturen vom Rektum werden bisweilen Gonokokken gefunden, während die Ausstrichpräparate negativ sind.

Die nach chemotherapeutischer Behandlung auftretenden Rezidive stellen sich oft sehr spät ein und lassen sich in vielen Fällen nur durch Kultur feststellen. Manche Patienten treten nach der Chemotherapie in ein Stadium latenter Gonorrhöe ohne klinische Symptome ein. Sie können lange Zeit symptomfreie Ansteckungsträger sein, und die Gonokokken können in vielen Fällen nur durch die Kultur nachgewiesen werden. Da die von diesen latenten Keimträgern angesteckten Personen ebenfalls eine gegen Chemotherapie resistente Gonorrhöe bekommen, stellen die latenten Gonokokkenträger eine schwere öffentliche Gefahr dar, weshalb eifrig nach ihnen zu fahnden ist, und zwar besonders mittels Kultur.

Bei der Bestimmung der Chemoresistenz *in vitro* gegen Sulfathiazol und Sulfapyridin hat sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen dem Resistenzwert und dem klinischen Behandlungserfolg herausgestellt. Die Prognose bei chemotherapeutisch behandelter Gonorrhöe lässt sich also mit grosser Sicherheit aus der Chemoresistenzbestimmung ablesen.

Der Verf. schlägt vor, bei allen Fällen von frischer Gonorrhöe die Gonokokkenkultur und die Chemoresistenzbestimmung durchzuführen, um so die Behandlung und vor allem die Kontrolle nach beendigter Behandlung gemäss den Resistenzwerten gestalten zu können. Patienten mit *in vitro* resistenten Stämmen sind am besten bis zur endgültigen Heilung im Krankenhaus zu isolieren, so dass sie keine Möglichkeit haben, andere mit diesen resistenten Gonokokken anzustecken.

Sowohl die praktische Erfahrung als auch experimentelle Untersuchungen sprechen dafür, dass Präparate der Sulfathiazolgruppe solchen der Sulfapyridin- und der Sulfanilamidgruppe vorzuziehen sind. Bei der Prüfung neuer Präparate ist stets auch die Chemoresistenzbestimmung auszuführen.

In klinisch chemoresistenten Fällen ist eine erneute Behandlung mit stark erhöhter Dosis durchzuführen. Dies dürfte grössere Aussicht auf Erfolg haben, als wenn man wiederholte Versuche mit der beim ersten Male angewandten Dosis macht.

## LITERATUR

1. Berglund, H. & Frisk, A. R.: Nord. Med. 1941:12:3610.
2. Bieter, Baker, Beaton, Shaffer, Seery & Orr: J. A. M. A. 1941:116:2231.
3. Bonnevie, P.: Ugeskrift f. Læger 1941:103:1342.
4. Carpenter, C. M., Leahy, Alice D. & Wilson, K. M.: Am. J. Syph. Gon. Ven. Dis. 1938:22:55. (Zit. n. Reymann 34).
5. Christiansen, W. & Becker, H.: Münch. med. Wschr. 1938:85:990.
6. Engleson, H. & Engleson, G.: Acta Derm. Venereol. 1940:21:123.
7. Falk, C. A.: Sv. Läkaresällsk. förh. 4/2 1941:Nord. Med. 1941:10:1965.
8. Felke, H.: Dermat. Wschr. 1938:106:110. (Zit. n. Göhring 11).
9. — Klin. Wschr. 1939:18:I:568.
10. Fröhlich, H. & Jordan, P.: Med. Klin. 1932:28:1163. (Zit. n. McLeod 25).
11. Göhring, G.: Zentr.-blatt Bakteriolog. 1939:144:480.
12. Hagerman, G.: Lunds Läkaresällsk. förh. 28/1 1941:Nord. Med. 1941:12:3534.
13. Hamann, H.: Therapie der Gegenw. 1941:6:250. (Ref. Münch. Wschr. 1941:88:1097).
14. Hazthausen, H.: Ugeskrift f. Læger 1941:103:1576.
15. Herlitz, S.: Sv. Läkaresällsk. förh. 4/2 1941:Nord. Med. 1941:10:1961.
16. Hrad, O. & Petrin, J.: Wiener klin. Wschr. 1941:54:650.
17. Hämel, J. & Link, Th.: Münch. med. Wschr. 1941:88:179.
18. Kimmig, J. & Vonkennel, J.: Ergebn. Hyg. Bakt. 1941:24:419.
19. Kjellberg, Gerda: Sv. Läkaresällsk. förh. 4/2 1941:Nord. Med. 1941:10:1969.
20. Krückeberg, B.: Dermat. Wschr. 1937:105:1525. (Zit. n. Göhring 11).
21. Lockwood, J. S. & Lynch, H. M.: J. A. M. A. 1940:114:935.
22. Lomholt, S.: Dermat. Sällsk. förh. 11/12 1940:Nord. Med. 1941:12:3381.
23. Löhe, H. & Brett, R.: Deutsche med. Wschr. 1941:67:971.
24. McLeod, J. W., Coates, J. C., Happold, F. C., Priestly, D. P. & Wheatly, B.: J. Path. Bact. 1934:39:221.
25. MacLeod, Colin M. J.: J. Experimental Medicine 1940:72:217.
26. Miescher, G.: Schw. med. Wschr. 1940:70:891.
27. — & Schnetz, A.: Schw. med. Wschr. 1941:71:175.
28. Moeschlin, S.: Schw. med. Wschr. 1941:71:789.
29. Neumann, H.: Arch. f. Dermat. u. Syph. 1936:173:393. (Zit. n. Göhring 11).

30. *Neumann, H.*: Dermat. Wschr. 1938 : 106 : 325. (Zit. n. Göhring 11).
31. *Périn, L. & Marcéron, L.*: Bull. Soc. franc. Dermat. 1941 : 48 : 148.  
(Ref. Zentr.-blatt Haut u. Geschl.-krankh. 1941 : 67 : 468).
32. *Philipp, E.*: Deutsche med. Wschr. 1941 : 67 : 794.
33. *Reymann, F.*: Acta Derm. Venereol. 1939 : 20 : 599.
34. — Ugeskrift f. Læger 1940 : 102 : 307.
35. — Dyrkning af Gonokokker som diagnostisk Metode ved Kvindegonorrhoe. København 1941.
36. *Ruys, A. Charlotte & Jens, P. A.*: Münch. med. Wschr. 1933 : 80 : 846.
37. — J. A. M. A. 1935 : 104 : 1844.
38. *Schmith, K.*: Experimental studies on the effect of sulfapyridine on pneumococci and gonococci. Kjøbenhavn 1941.
39. *Schmith, K. & Reymann, F.*: Nord. Med. 1940 : 8 : 2493.
40. — Nord. Med. 1940 : 8 : 2500.
41. *Sommer, K. & Rütther, H.*: Deutsche med. Wschr. 1939 : 65 : 90.
42. *Strandberg, J.*: Sv. Läkaresällsk. förh. 4/2 1941 : Nord. Med. 1941 : 10 : 1958.
43. *Uhle, Ch. A. W., Leroy, W., Latowsky, W. & Knight, F.*: J. A. M. A. 1941 : 117 : 247.
44. *Van Slyke, C. J., Wolcott, R. R. & Mahoney, J. F.*: J. A. M. A. 1941 : 116 : 276.
45. *Wilde, H.*: Münch. med. Wschr. 1941 : 88 : 1087.
46. *Willners, G.*: Sv. Läkaresällsk. förh. 3/2 1942 : Nord. Med. 1942 : 14 : 1688.
47. *Vonkennel, J. & Kimmig, J.*: Klin. Wschr. 1941 : 20 : 2.

## RECHERCHES SUR LA FERMENTATION MUTATIVE DES BACTÉRIES

Par *Martin Kristensen*.

(Reçu par la Rédaction le 26. 7. 1942).

### VII. FERMENTATION MUTATIVE DU BACILLE TYPHIQUE ENVERS LA DULCITE, L'ARABINOSE ET LE XYLOSE

Au chapitre VI (vol. XIX, p. 551) on a parlé de la mutation *primaire* du bacille typhique sur milieu contenant du xylose, par laquelle est supprimée la combinaison existante d'un faible pouvoir fermentatif et d'une croissance entravée. On exposera ici un nombre d'expériences faites avec les mêmes souches du type II, qu'on a mentionnées dans le mémoire précédent, en vue de la fermentation mutative *typique* de la dulcité, de la l-arabinose et, surtout, du xylose, telle qu'elle apparaît à l'acidification (jaunissement d'un milieu contenant du bleu de bromothymol). Les espèces de sucre employées venaient de Merck.

Par ensemencement des 8 souches en ExB, partie sans addition, partie avec  $\frac{1}{2}$  % de dulcité, partie avec  $\frac{1}{2}$  % d'arabinose, la dulcité s'est montrée indifférente vis-à-vis de la croissance et de la production d'alcali (coloration bleue), aussi longtemps qu'aucune fermentation mutative ne s'était produite. Par contre on a observé un effet entravant (partie inconstant), fort ou faible, de l'arabinose envers toutes les

souches, excepté le numéro 2. Somme toute l'arabinose s'est montrée d'un effet moins entravant que le xylose.

Ensuite les 8 souches ont été ensemencées chacune dans 8 tubes de dulcite, 8 tubes d'arabinose et 8 tubes de xylose, après quoi on a exposé la moitié de chaque espèce de cultures à une température de 22°, l'autre moitié à une température de 37°. On a surveillé les tubes pendant 22 jours, pour autant qu'aucune acidification n'était survenue antérieurement. Dans toutes les souches on a observé une fermentation tardive des 3 espèces de sucre, exception faite du no. 8; ici aucun des tubes d'arabinose n'a fermenté.

Pour les signes de fermentation les époques suivantes sont les premières observées:

dulcite	jaunissement partiel	au bout de 10 jours,			
»	complet	»	»	»	11 »
arabinose	»	complet	»	»	3 »
xylose	»	partiel	»	»	4 »
»	complet	»	»	»	5 »

Dans le nombre de tubes suivant un jaunissement complet ou partiel s'est produit au bout de 22 jours:

cultivation à	22°	37°
dulcite	21	27
arabinose	6	5
xylose	7	32

Donc, la mutation envers le xylose s'est produite d'une manière beaucoup plus facile à 37° qu'à 22°, envers la dulcite il y avait une différence correspondante, mais plus petite, tandis qu'aucune différence appréciable n'était observée pour l'arabinose.

Qu'il s'agissait réellement d'une fermentation mutative envers l'espèce de sucre additionnée au milieu de base a été démontré par dissémination sur des plaques avec la même espèce de sucre. Pour les plaques aussi, la croissance et l'acidification se sont, somme toute, mieux réalisées à une température de 37° qu'à celle de 22°. Dans la plupart des cas il s'est produit sur les plaques une culture et de colonies bleues

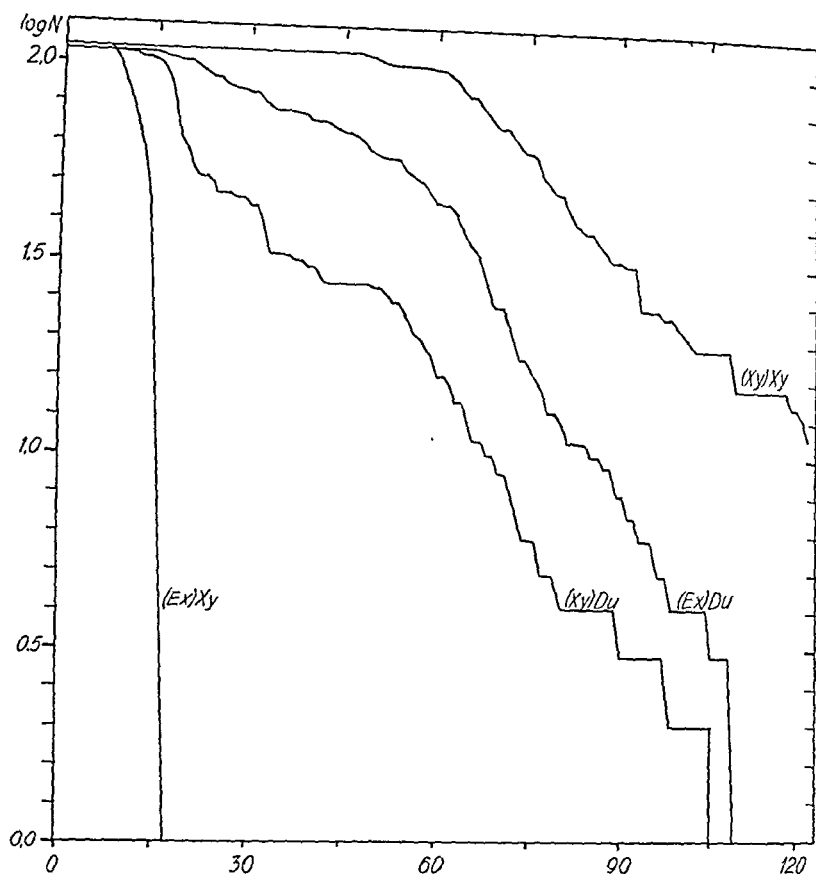


Fig. 5.

Cours de mutation dans quatre séries de 108 à 110 tubes chacune.

(Ex)Du: Forme originelleensemencée en dulcité.

(Ex)Xy: » » » » xylose.

(Xy)Du: » ayant subi la mutation primaire envers le xylose,ensemencée en dulcité.

(Xy)Xy: » ayant subi la mutation primaire envers le xylose,ensemencée en xylose.

et de colonies jaunes, ce qu'il faut considérer comme un témoignage de ce que la fermentation dans les tubes, desquels on avaitensemencé les plaques, avait été d'ordre mutatif. Dans quelques cas il ne s'est produit que des colonies jaunes; ce qui peut être attribué ou à une mutation, dans laquelle la forme primitive est complètement supprimée, ou à une

Tableau 9.

Résultat de disséminations sur plaques à dulcité ou à xylose, dont des tubes à milieu liquide contenant respectivement de la dulcité et du xylose ont jauni aux dates indiquées.

	Dulcité	Xylose
Colonies bleues		12. 12. 12. 12. 16. 16. 16. 16. 16. 16. 16. 21. 50. 87. 87.
Colonies jaunes	15. 15. 30. 33. 33. 33. 33. 33.	
Colonies bleues et jaunes	13. 15. 15. 30. 33. 34. 85. 87. 89. 90. 91.	8. 8. 8. 8. 9. 12. 12. 12. 12. 16. 16. 16. 16. 16. 16. 16. 39 — 49. 79. 79. 83. 84. 86. 86. 91. 93. 93. 93. 93. 93. 99.

fermentation primaire, mais lente; ceci est pourtant invraisemblable, si la fermentation survient beaucoup plus vite dans la culture secondaire sur la plaque que dans la culture primitive. Enfin il y avait plusieurs cas où seulement des colonies bleues s'étaient produites. Dans ces cas-ci le pouvoir fermentatif — primaire ou mutatif — a dû être trop faible pour pouvoir se manifester sur les plaques employées. Dans le nombre de souches suivant il s'est produit et des colonies bleues et des colonies jaunes sur une ou plusieurs des plaques ensemencées: dulcité 4, arabinose 3, xylose 7. Dans les autres cas il est du moins possible que la fermentation ait été mutative.

Ensuite la souche 6 a été ensemencée en 108 tubes d'ExB avec de la dulcité et en 110 tubes d'ExB avec du xylose; deux séries correspondantes ont été ensemencées de la même souche, après qu'on l'a d'abord fait subir la mutation primaire envers le xylose, mentionnée au chapitre VI. Nous désignerons ces 4 séries respectivement comme (Ex)Du, (Ex)Xy, (Xy)Du et (Xy)Xy. Les tubes ont été surveillé pendant 122 jours, pour autant qu'ils n'avaient pas jauni antérieurement. A 15—17 jours d'intervalle on a remplacé ce qui avait disparu par évaporation en additionnant de l'eau redistillée. On en a inscrit le résultat graphiquement dans la figure 5 en appliquant la



même construction que dans la fig. 4 (vol. XIX, p. 539). Nous voyons que c'est à peu près sans importance quant à la mutation envers la dulcité, si la culture a subi d'avance la mutation primaire envers le xylose ou non. Par contre y a une différence considérable entre les rapports des deux cultures envers le xylose: c'est seulement le 47<sup>e</sup> jour que la culture (Xy) Xy commence à donner une fermentation visible, tandis que les cultures (Ex)Xy fermentent à des époques beaucoup plus avancées.

D'une grande partie des cultures fermentantes on a fait une dissémination sur plaque avec l'espèce de sucre correspondante. Le résultat en ressort du tableau 9. Ici on a réuni les deux séries de dulcité, la différence en étant peu importante: de même on a réuni les deux séries de xylose, lesquelles sont pourtant faciles à distinguer l'une de l'autre, puisque toutes les fermentations survenues jusqu'au 39<sup>e</sup> jour inclus appartiennent à la série (Ex)Xy, les autres à la série (Xy) Xy. Il apparaît que toutes les cultures des séries de dulcité ont donné ou des colonies et bleues et jaunes, ou exclusivement des colonies jaunes, tandis que toutes les colonies des séries de xylose ont donné ou des colonies et bleues et jaunes, ou exclusivement des colonies bleues. Pour les cultures où toutes les colonies étaient ou bleues ou jaunes, la fermentation observée dans les tubes a vraisemblablement été mutative, une fermentation lente et primaire ayant dû se manifester d'une manière plus homogène dans les différents tubes de la même série. L'occurrence assez fréquente de plaques à colonies exclusivement bleues dans les séries de xylose, surtout dans la série (Ex)Xy, porte à croire qu'ici les mutants fermentent somme toute assez lentement. Ceci ressort aussi d'une évaluation des espaces de temps écoulés depuis le commencement du jaunissement jusqu'au jaunissement complet de chaque tube particulier. Tandis que dans les deux séries de dulcité, pour la plupart des cas, cet espace de temps n'a pas dépassé 3 jours, il a été souvent de 4 jours dans la série (Xy)Xy mutant tardivement, et même beaucoup plus long dans les cultures qui se sont teintes complètement en jaune au bout

de plus de 102 jours. Il est pourtant d'un intérêt tout particulier que l'espace mentionné est singulièrement long dans la série (Ex)Xy mutant précocement, où la plupart des cultures commençaient à devenir jaunâtres au bout de 6 ou 8 jours, tandis que les époques du jaunissement complet se trouvaient échelonnées dans une période allant du 7<sup>e</sup> jusqu'au 17<sup>e</sup> jour après l'ensemencement, le plus souvent du 13<sup>e</sup> jusqu'au 16<sup>e</sup> jour; une seule culture a jauni à une époque encore tardive, à savoir le 39<sup>e</sup> jour. Donc l'espace de temps écoulé du jaunissement commençant jusqu'au jaunissement complet a souvent constitué la moitié environ de l'espace entier de l'ensemencement jusqu'au jaunissement complet. On pourra donc admettre qu'il s'est écoulé plusieurs jours de la mutation même jusqu'au jaunissement commençant, et nous parvenons ainsi à ce résultat que la mutation même a dû se produire à une époque très précoce, vraisemblablement déjà au bout des premiers deux ou trois jours, ou que les cultures peut-être même avant l'ensemencement dans le milieu à xylose ont contenu quelques individus, faisant fermenter le xylose. Donc il y a lieu de distinguer nettement la rapidité dont la mutation survient d'avec la rapidité dont les mutants survenus fermentent.

Les deux courbes de dulcité et la courbe (Xy)Xy présentent une tendance prononcée vers un cours rectiligne, qui cependant ne commence que 2 mois c. après l'ensemencement. Autant qu'il est possible de juger d'après les espaces de temps s'écoulant depuis le jaunissement partiel jusqu'au jaunissement complet, la différence de temps entre la survenue de la mutation même et les jaunissements complets, survenus au bout de 60 à 100 jours, ne constitue vraisemblablement qu'une partie très petite et pas très variable de l'espace entier depuis l'ensemencement jusqu'au jaunissement complet; aussi la courbe de la survenue des mutations mêmes, correspondant aux jaunissements observés dans l'espace susdit, se montrerait-elle vraisemblablement assez rectiligne, s'il était possible de l'enregistrer. Cependant ceci ne signifiera qu'une tendance constante de mutation par rapport au nombre de bactéries, au cas où celui-ci est resté constant dans la même période.

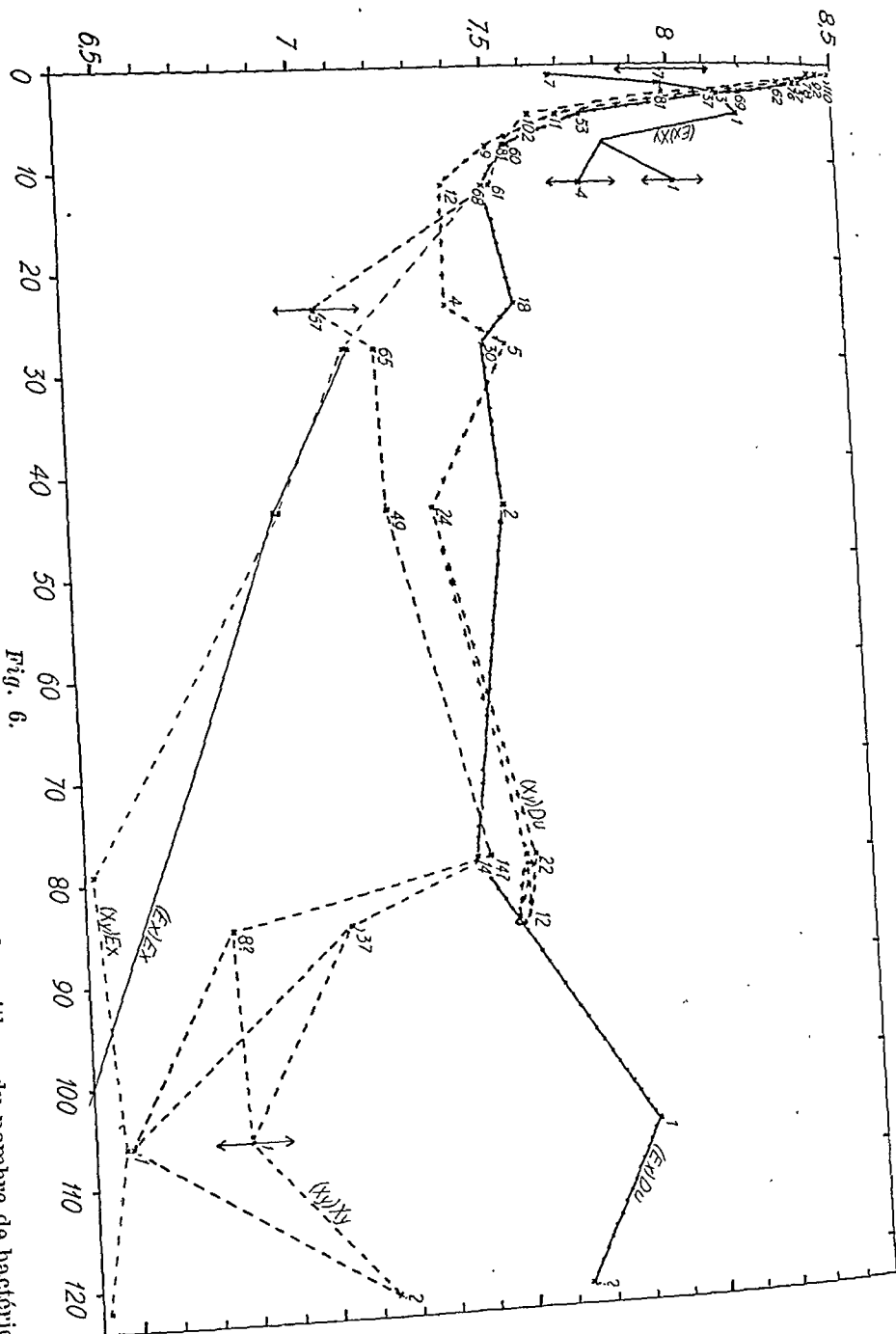


Fig. 6.

L'abscisse indique le nombre de jours après l'ensemencement, l'ordonnée le logarithme du nombre de bactéries dans les quatre séries, pour lesquelles le cours de mutation est inscrite dans la fig. 5, et dans deux séries de culture en ExB: (Ex)Ex = forme originelle, (XY)Ex = forme ayant subi la mutation primaire envers le xylose. Les chiffres dans la figure indiquent les nombres de jours en partant des dates en question jusqu'à la survenue du jaunissement dans le tube.

Les flèches indiquent l'intervalle dans laquelle se trouvent probablement les «vraies valeurs».

C'est pourquoi on a fait plusieurs énumérations vitales de bactéries, partie pour éclaircir la question, qu'on vient de signaler, partie pour examiner si la présence de la dulcité ou du xylose influe sur la croissance dans les cas où aucun signe visible de fermentation ne se présente.

La fig. 6 donne un aperçu du résultat de 56 calculs du nombre de bactéries vivantes dans des cultures d'âge différent pour les séries différentes. Pour ces calculs on a procédé de la manière suivante: le contenu du tube à examiner a été bien mélangé à l'aide d'une pipette Pasteur, au moyen de laquelle on a transporté à une pipette graduée, divisée en 1/100 c. c., une quantité que dans les divers cas variait entre 0,095 et 0,15 c. c. Dans un tube ou un ballon cette quantité a été mêlée avec une quantité connue de bouillon. Au moyen d'une pipette nouvelle on en a fait tant passer dans un ballon nouveau qu'on a obtenu la dilution désirée qui selon le nombre de bactéries attendu variait de 1:250.000 à 1:1000. Un fil de platine enroulé en spirale, d'un contenu de 0,03 c. c., a été rempli le plus uniformément possible de la dernière dilution, en portant une attention toute particulière à ce qu'il ne contint pas de bulles d'air. Ensuite on a frotté l'ocillet le plus complètement possible sur une plaque Conradi modifiée; ceci a été fait 6 fois en tout de la même culture diluée. Ensuite on a remis la culture originelle dans le thermostat pour en continuer l'observation.

Au bout de 1 ou 2 jours on a compté les colonies sur les plaques Conradi. On pourra citer en exemple qu'un délayage dilué à 10.000 fois d'une culture (Xy)Xy âgée de 24 jours a donné le nombre de colonies suivant: 24 + 31 + 31 + 31 + 36 + 46 = 199; chiffre moyen  $M = 33$ . Le nombre de bactéries dans la culture originelle sera donc calculé comme  $199 \cdot \frac{10000}{0.18} = 11,1$  millions. Réserve faite pour les variations fortuites qu'on va étudier ci-dessous, ce chiffre est un chiffre minimum: on suppose que toutes les bactéries vivantes se sont développées sur la plaque, et que chaque colonie ne procède que d'une seule bactérie. Quant au premier point c'est

très difficile d'établir un contrôle effectif; au sujet du deuxième point presque toutes les 54 cultures des tubes ont été examinées au microscope; de cette manière on a constaté que seulement à titre exceptionnel des bactéries se trouvaient accumulées; mais la plupart des individus étaient assez longs, souvent tout à fait filiformes, et en beaucoup de cas on pourrait les considérer comme des chaînes, formées de 2 ou 4 bactéries isolées. Si donc les chiffres absolus de bactéries doivent être acceptés avec grande réserve, les valeurs trouvées pourront cependant servir d'orientation dans la question à savoir, si les conditions de croissance ont été égales ou différentes dans les milieux contenant ou non de la dulcité ou du xylose; moins sûres seront les comparaisons de la croissance à des époques différentes dans le même milieu.

Même si une évaluation statistique des variations fortuites sera, sous ces conditions, d'une importance restreinte, les calculs qu'on va mettre en avant auront peut-être en d'autres cas une valeur réelle un peu plus grande. Dans l'exemple cité cidessus le carré de l'écart quadratique moyen a été calculé de la manière ordinaire comme  $(9^2 + 2^2 + 2^2 + 2^2 + 3^2 + 13^2) : 5 = 54$ . Si nous avons affaire exclusivement à une répartition fortuite des bactéries par rapport au volume de liquide (la répartition de *Poisson*) cette quantité équivaldrait en moyenne le nombre de bactéries comptées; pourtant dans l'exemple cité elle est  $t^2 = 1,64$  fois plus grande. La valeur de  $t^2$  a été calculée aussi pour chacun des 55 autres calculs; le nombre total des 56 valeurs est 64,83, donc un excès de 8,83 au dessus des 56 attendus. Cet excès peut être dû à des variations du remplissage de l'aiguille spirale + des raisons pas bien connues. Si nous supposons que ces sources d'erreur sont indépendantes du nombre de bactéries, on pourra les exprimer par un écart quadratique moyen relatif de  $\sqrt{\frac{8,83}{\sum M}} = 0,0415$  (c. à d. 4,15 %). Cependant, dans l'erreur fortuite entre aussi l'inexactitude de la préparation des dilutions de bouillon. Malheureusement celle-ci n'a pas été examinée de

plus près; par voie d'appréciation nous estimons à 10 % en tout l'écart quadratique moyen, provenant de là et des 4 % e. indiqués; ce qui serait plutôt une estimation assez large. On pourra donc assimiler tout l'écart quadratique moyen du nombre (n) de bactéries comptées à

$$(1) \quad \sqrt{\left(\frac{n}{10}\right)^2 + n}.$$

Quand il s'agit de trouver les deux valeurs (x) du nombre des bactéries, qui sont à deux fois leur écart quadratique moyen, respectivement au dessus de et au dessous de n, on peut déterminer x par l'équation

$$(2) \quad \begin{aligned} 2\sqrt{\left(\frac{x}{10}\right)^2 + x} &= \pm (x-n), \text{ dont} \\ x &= \frac{25}{24} \left( n + 2 \pm 2 \sqrt{\left(\frac{n}{10}\right)^2 + n + 1} \right). \end{aligned}$$

Dans l'exemple présent on trouve que, si la »vraie« valeur du nombre de bactéries (dans  $0,18 \cdot 10^{+4}$  c. c. de la culture originelle) est ou 159 ou 261, 199 se trouvera à une distance de 2 fois l'écart quadratique moyen. Dans la fig. 6 on a démontré par quelques exemples, combien la vraie valeur peut différer de la valeur trouvée, en laissant de côté les différences de plus de 2 fois l'écart quadratique moyen.

Le nombre de bactéries comptées dans les 56 séries a varié de 83 à 2447. Naturellement le nombre le plus bas donne la plus grande incertitude; ce nombre a été trouvé dans la culture »(Xy)Xy 3 jours«; sa limite d'erreur est aussi indiqué graphiquement dans la figure. L'incertitude des déterminations des concentrations de bactéries dans les tubes particuliers est donc en somme d'une importance secondaire, comparée aux différences auxquelles nous avons affaire en général. Par contre il faut se rappeler, comme on le démontrera ci-dessous, qu'il pourra très bien y avoir des différences des concentrations de bactéries entre les tubes divers non-fermentés de la même série. Pour les séries de dulcite le nombre de bactéries est resté singulièrement constant pendant une période allant de 12 jusqu'à 85 jours après l'ensemencement;

on ne peut attacher aucune importance aux deux dernières déterminations. Pour l'espace de 60 à 85 jours le cours rectiligne des courbes de dulcité dans la fig. 5 peut être considéré comme l'expression d'une tendance constante de mutation chez les bactéries. Pour la série (Xy)Xy il en est probablement de même jusqu'à 80 jours après l'ensemencement; ensuite une chute importante du nombre de bactéries se produit. — En comparant la courbe (Ex) Xy aux trois autres courbes on voit très distinctement l'entrave initiale de la croissance, déjà vaincue au bout de 3 jours, conséquence naturelle de ce que la forme primairement mutée domine à cette époque complètement la culture.

En outre nous voyons que dans les cultures plus anciennes, mais apparemment pas encore fermentées dans les milieux contenant de la dulcité et du xylose, il y avait une croissance beaucoup plus forte que dans les seuls milieux de base. D'une manière ou d'autre, ceci doit être dû à une utilisation de la substance additionnée, vraisemblablement sous forme d'une fermentation, qui, encore, peut être primaire ou mutative. De là il ne s'ensuit pas ce soit la dulcité ou le xylose mêmes qui ont été utilisés. D'une part il pourrait se faire qu'il s'agit d'impuretés se trouvant dès l'origine dans les préparations employées, d'autre part il faut compter que sans le concours des bactéries une lente destruction peut bien avoir lieu, et que les substances qui s'en forment peuvent être utilisées par les bactéries, chose qui a été très nettement observée pour le xylose: il s'est trouvé qu'au seul repos à 37° les tubes de xylose, à en juger par la couleur, ont modifié leur réaction vers l'acidité. Ceci étant particulièrement évident pour les tubes contenant de la bactopectone à 2 %, c'est de ces tubes qu'on s'est servi pour examiner de près ce détail.

Dans un tube de xylose, exposé depuis 7 semaines à une température de 37°,  $p_H$  se trouvait être 6,7 (colorimétrique), tandis que originairement il avait été 7,4 e.; dans un tube sans xylose aucune modification essentielle de la réaction ne se produisit à un séjour de thermostat. Par un titrage du tube

de xylose exposé pendant 7 semaines, la partie de la réduction qui n'était pas due au milieu de base était réduite de 20 % de sa valeur originelle. En comparant après 7 semaines d'incubation la réduction dans un milieu non-ensemencé à celle dans un milieu ensemencé, on a constaté que la croissance des bactéries dans un milieu sans xylose a abouti à un surcroît de réduction de 10 % e. de celle de xylose dans un tube frais, tandis que la croissance dans le milieu contenant du xylose a abouti à une diminution de réduction de 4 % e. En supposant égale la réduction propre des bactéries dans les deux tubes, tant de substance réductrice aurait été consommé que la valeur réductrice serait diminuée de 14 %. Comme il faut en effet supposer la réduction propre des bactéries plus grande dans le tube de xylose que dans le tube sans xylose, la croissance étant la plus forte dans celui-là, la diminution réelle du sucre réducteur devient encore plus grande. Ajoutez-y la possibilité qu'une partie du xylose soit encore convertie en un autre corps réducteur. Sous ses conditions on aurait pu mettre en question, si les fermentations tardives étaient en somme dues à la dulcité, respectivement au xylose, pour peu que, en disséminant sur plaque avec l'espèce de sucre correspondante, nous n'eussions pas observé la survenue de colonies jaunes.

Le nombre de bactéries par c. c. dans deux cultures en tubes sans xylose était  $18 \cdot 10^6$  et  $43 \cdot 10^6$ , dans les deux tubes avec xylose  $31,5 \cdot 10^6$  et  $48 \cdot 10^6$ . Dans ces cas la différence de croissance entre le milieu de base et le milieu de xylose était donc relativement petite, et, de plus, inconstante. En outre il se constate qu'il peut se produire une différence considérable du nombre de bactéries entre deux cultures du même âge (3 jours) et dans le même milieu, même si, à celui-ci, aucune espèce de sucre n'a été additionnée.

Si dans des échantillons provenant de deux tubes à comparer on a trouvé, en appliquant exactement la même technique, des colonies au nombre de  $n_1$  et  $n_2$ , on pourra juger de l'écart quadratique moyen de la différence de ces deux chiffres en traitant leur chiffre moyen, comme si c'était la



valeur réelle en appliquant la formule (1). L'écart quadratique moyen de la différence des deux calculs est  $\sqrt{2}$  fois l'écart quadratique moyen de la valeur réelle. La proportion de la divergence par rapport à son écart quadratique moyen sera alors

$$(3) \quad t = \frac{|n_1 - n_2|}{\sqrt{n_1 + n_2 + \frac{1}{2} \left( \frac{n_1 + n_2}{10} \right)^2}}$$

Le nombre de colonies était, dans les tubes sans xylose, 350 et 816, dont  $t = 5,3$ , dans les tubes avec xylose 575 et 928, dont  $t = 3,2$ .

Ainsi le résultat principal des expériences décrites sur le calcul de bactéries et le titrage devient une démonstration des différentes difficultés techniques auxquelles on s'expose à des expériences prolongées sur le cours de la fermentation mutative. Comme un des résultats positifs de l'enregistrement des époques de fermentation on signalera que les mutations dans les tubes particuliers de la même série surviennent à des époques sensiblement différentes; que la fréquence de mutation augmente, il est vrai, par rapport au nombre de tubes ou de bactéries, plus les cultures prennent de l'âge, mais que, aux stades ultérieurs, on y trouve une approximation au cours »monomoléculaire«. Il n'est donc pas question d'une survenance régulière de la mutation au bout d'un temps déterminé; il s'agit essentiellement d'un phénomène d'ordre statistique. Si on trouve — comme c'est le cas dans la série (Ex)Xy — que la fermentation visible dans les tubes se produit presque en même temps, ceci sera probablement en général le signe d'une fréquence de mutation si grande que la période d'incubation, depuis la mutation jusqu'à l'acidification visible dans la plupart des tubes, sera beaucoup plus grande que le temps qui s'écoule jusqu'à la survenance de la mutation même.

Il y avait lieu d'examiner si la mutation des cultures (Ex)Xy, beaucoup plus rapide que celle des cultures (Xy)Xy, était chose constante. Dans ce but les souches 2—8 (la der-

nière fois disséminées sur gélose ordinaire le 2 janvier 1940) ont été ensemencées le 27 avril et le 1<sup>er</sup> mai 1940, chacune en 3 séries réparties en 10 tubes, respectivement a) de ExB, b) d'une colonie (verte) non mutée et c) d'une colonie primairement mutée (bleue blanchâtre) sur plaque à xylose (ExB servant d'intermédiaire). Le petit tableau ci-dessous indique le nombre de jours s'écoulant jusqu'au jaunissement complet. Un chiffre mis entre parenthèses indique la dernière époque observée pour un jaunissement partiel, sans qu'un jaunissement complet se soit produit. 0<sup>93</sup> = aucun jaunissement après une observation de 93 jours. Les valeurs extrêmes seules sont indiquées.

Souche no.	a	b	c
2	8—16	8—15	14—23
3	6—24	9—19	47—(83)
4	7—9	6—10	8—11
5	8—38	8—19	38—77
6	6—9	7—11	5—6
7	8—22	7—14	5—6
8	11—0 <sup>93</sup>	7—0 <sup>91</sup>	(79)—0 <sup>91</sup>

On a donc pu classifier la plupart des séries comme mutant ou précocement ou tardivement; les séries a et b de la souche 8 présentaient une variation extraordinaire; mais toutes les séries a et b avaient ceci de commun que quelques-uns des tubes au moins mutaient précocement. Dans les séries c les souches 3 et 5 se comportaient essentiellement comme la série (Xy)Xy de la souche 6, tandis que la souche 8 était encore moins disposée à muter (9 d'entre 10 tubes étaient 0<sup>91</sup>). On a pu qualifier de mutants rapides les 4 autres souches des séries c, bien que le no. 2 fût relativement lent et les numéros 6 et 7 extraordinairement rapides.

Donc, les cultures ayant déjà subi la mutation primaire mutant dans quelques cas précocement, dans d'autres cas tardivement. De faire l'une ou l'autre chose ne paraît pas une qualité constante pour chaque souche: pour la souche 6 nous avons eu dans l'expérience précédente une mutation tardive, mais cette fois-ci une mutation précoce. Pour constater si une telle variation était fréquente dans la même

souche; on a dû procéder à un examen de plusieurs séries de la même souche.

Dans ce but on aensemencé le 7 et 8 juin 1940 les souches

Tableau 10.

		Séries de 6 tubes chacune	Tubes avec fer- mentation	Tubes sans fer- mentation	Moyenne des tubes fermentés	Médiane de tous les tubes	Variation interieure	Variation totale
Séries à mutation précoce	3, forme verte.....	10	60	0	12.8	11	4.1	4.5
	4, „ „ .....	10	59	1	9.9	9	1.9	2.4
	5, „ „ .....	10	60	0	13.2	12	4.4	4.0
	6, „ „ .....	5	30	0	10.7	10	3.1	2.9
	7, „ „ .....	10	60	0	8.6	8	1.4	1.6
	8, „ „ .....	7	39	3	11.3	9	7.1	6.2
	6, forme bleue blanchâtre .....	6	36	0	6.2	6	0.73	0.45
	8, „ „ „ .....	8	48	0	6.0	6	0.72	0.90
Toutes les séries à mutation précoce		66	392	4	10.0	9	2.8	4.2
6, dissém. de série à mut. précoce 1		10	60	0	6.6	6	0.74	0.75
6, „ „ „ „ „ 2		10	60	0	6.3	6	0.80	0.97
6, les deux séries en bloc.....		20	120	0	6.5	6	0.77	0.88
Séries à mut. tardive	4, forme bleue blanchâtre	10	58	2	59.4	53	18.0	23.4
	5, „ „ „	10	51	8	76.7	80	21.8	21.3
	6, „ „ „	2	9	3	98.1	110	24.4	23.4
	7, „ „ „	9	52	1	64.8	61	25.4	28.8
Toutes les séries à mutation tardive		31	170	14	67.4	72	21.9	27.3
6, dissém. de série à mut. tardive 1		10	43	17	70.3	80	15.5	15.6
6, „ „ „ „ „ 2		10	44	15	70.3	83	18.8	17.0
6, les deux séries en bloc .....		20	87	32	70.3	82	17.2	16.1

3—8 dans du bouillon de xylose; de là dissémination sur plaque de xylose, ensemencement des colonies vertes et bleues blanchâtres en ExB et ensuite ensemencement dans 6 tubes de xylose de chaque culture de colonies. Le temps d'observation était 120 jours. On peut diviser les séries formées, dont on ne fera aucun exposé in extenso, en des mutants es-

sentiellement précoces et des mutants essentiellement tardifs. Dans le premier groupe le chiffre moyen de l'époque du jaunissement complet était 10 jours, la valeur médiane 9 jours; dans l'autre groupe le chiffre moyen était 69 jours, la valeur médiane 72 jours. En calculant le chiffre moyen on a seulement tenu compte des tubes, dans lesquels un jaunissement complet s'était produit, tandis que tous les tubes (exception faite de quelques-uns qu'on a dû éliminer à cause d'un accident quelconque) ont été pris en considération pour la détermination de la valeur médiane.

Le tableau 10 donne un aperçu du nombre de séries mutant essentiellement à une époque avancée, et de séries mutant essentiellement à une époque tardive, provenant de colonies vertes et bleues blanchâtres des différentes souches, les matériaux ayant été divisés pour l'orientation en des séries rapides et des séries lentes. Ensuite vient le nombre de tubes avec et sans jaunissement complet, le chiffre moyen des époques de jaunissement complet dans le premier groupe, la valeur médiane des époques de jaunissement complet dans l'ensemble de tubes, et, enfin, la valeur numérique de la variation »intérieure« et »totale«. Ces expressions sont à comprendre comme suit:

Au lieu du calcul généralement employé de l'écart quadratique moyen, qui, pour un sujet comme celui qui nous occupe, est sans autre justification que celle de l'usage courant, on a fait le calcul le plus élémentaire et le moins arbitraire qu'on puisse imaginer, quand il faut prendre en considération les valeurs particulières, à savoir le chiffre moyen arithmétique de l'ensemble des différences entre les valeurs du groupe pris deux par deux. Cependant on a dû laisser de côté les tubes sans jaunissement complet. Ce calcul a été fait partie dans l'ensemble de chaque groupe (»variation totale«), partie dans chaque série de 6 tubes (au plus); dans ce dernier cas le nombre total de toutes les différences a été divisé par le nombre de différences; ainsi se produit le chiffre de la »variation intérieure«. Si les époques de la mutation varient également, soit que les cultures proviennent de la même co-

lonie, soit qu'elles proviennent de colonies différentes, les chiffres de la variation »intérieure« et »totale« doivent être à peu près identiques; si par contre il y a une différence essentielle de la progéniture des colonies particulières, il faut s'attendre à une variation moyenne plus grande dans tout le groupe que dans les séries particulières. Il se trouve que, tant que nous nous en tenons au groupe des séries mutant tôt ou tard dans une souche donnée, la variation totale est tantôt un peu au dessus, tantôt un peu au dessous de la variation intérieure. Si, par contre, nous prenons toutes les séries précoces ou toutes les séries tardives en bloc, nous obtenons une valeur plus grande pour la variation totale que pour la variation interne; ceci est l'effet de certaines disséminances entre les souches différentes de chacun des deux groupes principaux, lesquelles ressortent encore plus nettement des valeurs inscrites dans le tableau pour chaque souche particulière.

Dans le tableau on trouvera enfin inscrit le résultat de quelques disséminations secondaires provenant de 4 des cultures »bleues blanchâtres« de la souche 6, à savoir 2 de celles qui par l'ensemencement dans une série de tubes de xylose s'étaient manifestées comme mutant précocement, et 2 de celles qui s'étaient manifestées comme mutant tardivement. Ici aussi la variation sera la même, soit que les tubes sont ensemencés de la même colonie, soit qu'ils sont ensemencés de colonies différentes de la même dissémination.

Il ressort des expériences faites sur les disséminations secondaires que la rapidité de mutation reste très constante, en tout cas dans les proportions limitées dérivant du fait qu'on n'a comparé que des cultures ensemencées de la même dissémination d'une culture, récemment isolée elle-même d'une colonie particulière. Il n'a pas été possible d'éclaircir comment il se fait que la souche 6 a fini par se composer d'éléments qui — après la mutation primaire — sont capables de muter partie précocement, partie tardivement. Que ce soit l'effet d'un mélange originel et fortuit des deux formes est extrêmement invraisemblable; car premièrement les bacilles

typhiques du type II ne sont pas d'une telle fréquence qu'il y a une vraisemblance notable pour que le même malade soit infecté des deux formes; deuxièmement on a entrepris la dissémination au moins une fois après la dissémination primaire de fèces, mais, il est vrai, pas de »culture unicellulaire« spéciale. On ne peut pas non plus imaginer que 6 des 8 cultures de la forme »bleue blanchâtre« de la souche auraient été contaminées par la forme »verte«.

Cependant, plus tard, on a fait une expérience sur la progéniture des cultures unicellulaires des souches 5, 6, 7 et 8, en ensemençant, e. 6 mois et demi après la préparation des cultures unicellulaires, de chaque souche hors de 7 ou 8 colonies vertes et autant de colonies bleues blanchâtres dans un tube d'ExB et ensuite dans 6 tubes de xylose. Il en résulte qu'il faut qualifier de précocement mutant toutes les 30 séries provenant de colonies vertes. Quant à la forme bleue blanchâtre toutes les 7 colonies de la souche 6 appartiennent cette fois-ci à un type intermédiaire de la mutation, les 7 fois 6 tubes jaunissant au bout de 18 à 28 jours (Les cultures provenant des colonies vertes de la même souche ont muté à une époque beaucoup plus précoce, les tubes jaunissant dans une période allant du 6<sup>e</sup> au 19<sup>e</sup> jour). Une seule culture entre les cultures de la forme bleue blanchâtre provenant des souches 5, 7 et 8 ont donné jaunissement le 30<sup>e</sup> jour: dans aucun des autres tubes provenant de ces 3 souches on a observé à cette époque des signes de fermentation. Donc on n'a pas pu observer pour les cultures unicellulaires la même dissociation qu'auparavant pour les cultures, isolées de manière ordinaire à l'état de pureté; mais ceci peut être dû au hasard.

Il est frappant de voir que la forme »verte« des souches différentes mute régulièrement à une époque précoce, tandis que dans la plupart des cas la forme bleue blanchâtre mute assez tard. C'est que la forme verte se transforme facilement en la forme bleue blanchâtre, quand on la cultive dans un milieu de xylose, et à l'époque où on constate la mutation il restera sûrement à l'ordinaire très peu de la forme verte dans les tubes. Cependant il importe d'appeler l'attention sur

le fait qu'en tout cas les variantes mutant le plus rapidement ont selon toute vraisemblance muté au bout des 2 ou 3 premiers jours. On pourra donc supposer que les éléments mutants de la forme verte sont immédiatement transformés en la forme acidifiante, sans avoir passé par le stade intermédiaire bleu blanchâtre.

Evidemment on ne peut pas juger de cette question en examinant des cultures dans un milieu liquide, on pourra cependant — bien qu'avec quelque incertitude — l'éclaircir en observant des disséminations sur plaque de xylose. Dans l'ensemencement des souches 2, 3, 5, 6 et 7 on a observé, au bout de quelques jours d'incubation, des bourgeons jaunes. Dans les souches 2, 3 et 6 des bourgeons jaunes ont apparu directement dans les colonies vertes, sans qu'on ait observé un stade intermédiaire bleu blanchâtre; dans les souches 3, 5, 6 et 7 on a vu l'apparition de bourgeons jaunes dans les colonies bleues blanchâtres. Les colonies primaires et secondaires en question ont été examinées partie en faisant un faible grossissement microscopique, partie en ensemençant sur plaque de xylose de différentes parties de l'ensemble de colonies. Ce n'est pas toujours possible, à l'inspection immédiate d'un bourgeon à une époque quelconque, de déterminer s'il appartient à la forme bleue blanchâtre ou à la forme jaune, les bourgeons qui jauniront plus tard ayant dès le début une certaine ressemblance avec la forme d'un bleu blanchâtre permanent; quand le bourgeon jaunit ce sera surtout dans la partie centrale; celle-ci n'est pas nettement séparée de la partie périphérique, et en ensemençant, et de la partie centrale et de la partie périphérique, on voit paraître dans les deux cas une culture pure de colonies jaunes.

Ce qui surprend dans ces expériences de dissémination sur plaque est la fréquence avec laquelle apparaissent des bourgeons jaunes dans les colonies bleues blanchâtres. Il y a ici une discordance apparente d'avec la survenue relativement rare de mutation jaune dans les cultures liquides. On pourrait imaginer que la mutation aurait lieu beaucoup plus vite sur plaque que dans le milieu liquide. A un certain degré

ceci est possible; mais sans doute un autre facteur joue un plus grand rôle: dans un ensemencement sur plaque de xylose de la forme verte l'occasion se présente de constater la transformation de la forme bleue blanchâtre en forme jaune, même si cette mutation n'intervient que dans un nombre restreint des colonies. Si au contraire on isole une colonie bleue blanchâtre quelconque celle-ci sera peut-être dans la plupart des cas un mutant tardif. Selon cette hypothèse il y aurait donc en général dans la forme bleue blanchâtre mutant primairement tant d'éléments mutant précocement que d'éléments mutant tardivement, dont ceux-là sont d'ordinaire en minorité: mais la chance qu'a la forme verte de muter précocement sera donc, même après la transformation en forme bleue blanchâtre, beaucoup plus grande, que la chance d'une mutation précoce dans une culture pure d'un élément »bleu blanchâtre« choisi au hasard.

Dans toutes les expériences décrites ci-dessus c'est bien entendu que nous avons constamment eu affaire à des bactéries typhiques et non à des contaminations. La justesse de cette supposition a été contrôlée par un nombre considérable de microscopies de cultures en milieu liquide, et par des examens sérologiques et fermentatifs de colonies particulières.

### *Résumé.*

1. Les expériences comparatives sur le pouvoir des bacilles typhiques du type II de muter envers la dulcité, la l-arabinose et le xylose, faites à des températures différentes, ont montré que dans aucun cas une température de 22° a fourni de meilleures conditions à la survenue des mutations qu'une température de 37°, mais la température de 22° a donné ou (pour la l-arabinose) essentiellement le même résultat ou (pour la dulcité et, surtout pour le xylose) une fréquence de mutation beaucoup plus basse.

2. Le cours de mutation envers la dulcité et le xylose a



été examiné dans un grand nombre de tubes, qui ont été ensemencés partie de la forme originelle, partie de la forme ayant subi la mutation primaire envers le xylose. La forme originelle a vite muté envers le xylose, tandis que la forme déjà mutée primairement a muté extraordinairement tard. Envers la dulcité les deux formes se comportaient à peu près de même, la mutation des différents tubes commençant assez tard, mais se prolongeant sur un espace de temps assez considérable. Par rapport au nombre de bactéries la fréquence de mutation augmentait envers la dulcité et (pour la mutation tardive) envers le xylose pour marquer ensuite (du moins pour la dulcité) une tendance vers une valeur maximum assez constante. Pas plus que dans les expériences antérieures sur *Salmonella dublin* envers la l-arabinose on pourrait parler d'une époque déterminée et typique pour la survenue de la mutation. Là où il en paraissait ainsi (à savoir pour la série mutant précocement) l'explication en est que la plus grande partie du temps apparent de mutation est constitué par la période d'incubation depuis la survenue de la mutation jusqu'à sa manifestation visible; par ceci les variations des époques mêmes de mutation sont recouvertes, même si, relativement parlant, ces variations varient autant que les mutations tardives.

3. On rapporte des expériences et des évaluations de calculs de bactéries vivantes en culture liquide.

4. En poursuivant les examens de la fermentation mutative de xylose on a trouvé que la forme originelle («verte») du bacille typhique (type II) a donné constamment des séries de mutation, complètement ou pour la plupart, précoce, tandis que la forme mutée primairement («bleue blanchâtre») a donné une mutation tardive dans la majorité des cas.

5. La progéniture de la même dissémination d'une culture récemment isolée elle-même d'une colonie particulière, se comporta d'une manière assez égale, soit qu'on compare les tubes d'une même colonie ou les tubes de colonies différentes, mais provenant de la même dissémination.

6. La fermentation mutative de la forme originelle envers le xylose paraît se produire partie directement, partie avec la mutation primaire comme intermédiaire.

## DIE NATÜRLICH VORKOMMENDEN UND DIE SYNTHETISCH HERGESTELLTEN OESTROGENEN STOFFE

IHR SCHICKSAL IM ORGANISMUS UND  
IHRE TOXISCHE WIRKUNG.

Von *Tage Kemp* und *Kaj Pedersen-Bjergaard*.

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. August 1942).

Die Aufnahme- und Ausscheidungsverhältnisse bei den natürlich vorkommenden oestrogenen Stoffen, den eigentlichen Sexualhormonen, sind schon seit langem gründlich untersucht worden. Nach peroraler Eingabe werden sie in den Organismus aufgenommen, ohne von den Sekreten des Magen-Darmkanals zerstört zu werden. Diejenigen von ihnen, die auf dem Wege über die Vena portae zur Leber geführt werden, werden, wie von *Pedersen-Bjergaard* gezeigt wurde, zu einem wesentlichen Teile in diesem Organe abgebaut und kommen daher nicht dazu, ihre Wirkung auf die Geschlechtsorgane oder überhaupt auf den Organismus zur Entfaltung zu bringen. Aus dem zirkulierenden Blute verschwindet das Oestrin, selbst wenn die Leber aus dem Kreisläufe ausgeschaltet ist, sehr schnell, während ein geringer Teil, nur einige wenige Prozent (*Kemp & Pedersen-Bjergaard*), durch die Nieren ausgeschieden wird.

12 Jahre sind verflossen, seitdem *Doisy* und *Butenandt* unabhängig voneinander imstande waren, das weibliche Ge-

schlechtshormon Follikulin (syn. Oestrin, Oestrone) in chemisch reiner, kristallinischer Form herzustellen. Insgesamt sind 7 verschiedene in der Natur vorkommende oestrogene Stoffe isoliert und reindargestellt worden. Später gelang es dem Engländer *Dodds* und seinen Mitarbeitern auf synthetischem Wege eine Reihe verschiedener Stoffe mit oestrogener Wirkung herzustellen.

Die wichtigsten oestrogenen Stoffe sind:

Die natürlich vorkommenden:	Oestrone	$C_{18}H_{22}O_2$
	Oestradiol	$C_{18}H_{24}O_2$
Die synthetisch hergestellten:	Stilboestrol	$C_{18}H_{22}O_2$
	Dinoestrol	$C_{18}H_{20}O_2$
	Hexoestrol	$C_{18}H_{24}O_2$

Die Bruttoformeln der genannten Stoffe weichen, wie man sieht, verhältnismässig wenig voneinander ab; doch sind ihre Strukturformeln sehr verschieden, da nur die natürlich vorkommenden Hormone den Phenanthrenkern enthalten, die übrigen dagegen einen einfacheren Bau aufweisen und nur 2 sechsgliedrige Ringe enthalten.

Alle die genannten Stoffe werden nun in recht beträchtlichem Umfang angewandt, und es liegen zahlreiche ziemlich divergierende Untersuchungen über die physiologischen Wirkungen und die therapeutischen Eigenschaften der synthetischen oestrogenen Stoffe vor. Einige Autoren verwerfen völlig die Anwendung der synthetisch hergestellten oestrogenen Hormone in der Therapie, indem sie hervorheben, dass dieselben teils toxisch sind und teils auch andere physiologische Eigenschaften als die natürlich vorkommenden haben: doch wird andererseits auch von vielen betont, dass die synthetischen oestrogenen Stoffe in therapeutischer Hinsicht sich vollauf mit den natürlich vorkommenden messen können, ja sogar noch gewisse Vorzüge ihnen gegenüber bieten. Die umfassende Literatur über dieses Gebiet wurde kürzlich eingehend in 2 grossen Übersichtsartikeln besprochen, weswegen sie hier nicht näher behandelt werden soll. Der eine Artikel ist von *Lange-Sundermann* und kommt zu dem Schluss, dass man jedenfalls vorläufig sich ausschliesslich an die natürlich vor-

kommenden oestrogenen Stoffe zu halten hat, während in dem anderen Artikel von *Huf* behauptet wird, dass die synthetischen oestrogenen Stoffe sich in wesentlichen wie das Follikelhormon verhalten und nicht giftiger als dieser Stoff sind.

Die synthetisch hergestellten oestrogenen Stoffe unterscheiden sich unter allen Umständen in mehreren Punkten von den natürlich vorkommenden. U. a. hat *Stroud* die Ausscheidung den oestrogenen synthetischen Stoffe in dem Urin nach parenteraler Injection untersucht. Von Hexoestrol wird 21,3 % ausgeschiedet, von Dinoestrol 7,2 %, von Stilboestrol 17—25 % und von Oestrone 1,5 % ausgeschiedet. Ferner werden die synthetischen oestrogenen Stoffe nicht in der Leber abgebaut, weswegen sie auch eine verhältnismässig grössere perorale Wirkung haben. Diese Verhältnisse haben wir durch eine Reihe von Versuchen näher beleuchtet.

Die Versuche wurden an kastrierten Rattenweibchen ausgeführt, indem in der üblichen Weise die Wirkung auf das Scheidenepithel untersucht wurde. Die perorale Dosis der verschiedenen Stoffe wurde in wässriger Lösung mit Hilfe der Magensonde zugeführt, die parenterale wurde in wässriger Lösung subkutan injiziert. Sowohl die perorale als auch die parenterale Dosis wurden in 5 Portionen im Laufe von 50 Stunden eingegeben. Zur Bestimmung der Dosis, die eine positive Reaktion bei der Hälfte der Versuchstiere hervorruft, wurden kastrierte Rattenweibchen von ca. 150 g Gewicht sowie kastrierte Mäuseweibchen von ca. 20 g Gewicht angewandt. In jedem einzelnen Falle kamen 50—100 Tiere zur Anwendung.

Tabelle 1.

Stoff	Ratten		Mäuse	
	Parenterale Dosis in γ	Perorale Dosis in γ	Parenterale Dosis in γ	Perorale Dosis in γ
Oestrone	1,11	220	0,19	11,7
Oestradiol	0,15	90	0,10	7,5
Stilboestrol	0,40	4	0,10	0,25
Hexoestrol	0,50	40	0,40	4,0
Dinoestrol	1,33	4	0,20	0,5

Es geht aus dieser Tabelle hervor, dass die parenterale Dosis von ungefähr der gleichen Grössenordnung für die 5 Stoffe ist, während die perorale Dosis mehr variiert. Die Frage liegt nun nahe, worauf der zwischen den peroralen Dosen der verschiedenen Stoffe bestehende Unterschied beruht.

Durch Versuche, die hier nicht im einzelnen besprochen werden sollen, wurde nachgewiesen, dass das Oestrone (bzw. das Oestradiol) bei Ratten nicht unresorbiert im Kote ausgeschieden, nicht von den Enzymen des Magen-Darmkanales zerstört und auch nicht vom Magen resorbiert wird, sondern dagegen schnell und fast vollständig vom Dünndarm. Bei Ratten werden nur 2 % des resorbierten Oestrones im Urin wiedergefunden; der Rest muss also entweder zerstört oder im Organismus gebunden worden sein. Um zu untersuchen, in welcher Weise dieser Abbau oder diese Bindung vor sich geht, wurde folgender Versuch ausgeführt:

Bei narkotisierten, kastrierten weiblichen Ratten wurde mittels der von *Pedersen-Bjergaard* ausgearbeiteten Technik in einen der feineren Seitenäste der Vena portae im Gekröse eine wässrige Lösung eines der oestrogenen Stoffe injiziert. Bei einer entsprechenden Anzahl Kontrolltiere wurde eine gleiche Injektion in die Vena femoralis vorgenommen, sodass der oestrogene Stoff unmittelbar in den Kreislauf gelangte, ohne erst durch die Leber passieren zu müssen. Das Ergebnis der Versuche geht aus der Tabelle 2 hervor:

Tabelle 2.

Stoff	Intravenöse Dosis in $\gamma$	
	Vena portae	Vena femoralis
Oestrone	2500	250
Oestradiol	500	150
Stilboestrol	275	225
Hexoestrol	333	267
Dinoestrol	15	30

Aus der Tabelle ist zu ersehen, dass 90 % der in die Vena portae injizierten Oestronemenge, ca.  $\frac{2}{3}$  des Oestradiols, in der

Leber inaktiviert worden sind, aber dagegen praktisch genommen nichts von den synthetischen Verbindungen.

Bei Versuchen an ausgewachsenen kastrierten weiblichen Ratten zeigte sich weiterhin, dass die Oestronedosis, welche zugeführt werden musste, um Kornifikation des Scheidenepithels bei 50 % der Tiere hervorzurufen, 200  $\gamma$  bei der Oellösung betrug und 220  $\gamma$  bei der wässrigen Lösung, wenn die Dosis auf 5 Portionen im Laufe von 50 Stunden verteilt mit der Sonde gegeben wurde. Das in Oel gelöste Oestrone hat also keine wesentlich grössere perorale Wirkung als das in Wasser gelöste.

Es liegen verschiedene Veröffentlichungen vor, die zu zeigen scheinen, dass die synthetischen oestrogenen Stoffe histologisch nachweisbare toxische Eigenschaften haben. Grumbrecht & Loeser haben kürzlich berichtet, dass das Stilboestrol in Tierversuchen histologisch nachweisbare toxische Eigenschaften hat. Die diesbezüglichen Mitteilungen sind sehr eingehend und mit zahlreichen Mikrophotographien versehen. Die Autoren gaben jungen Ratten, welche bei Versuchsbeginn ca. 50—60 g wogen, täglich 1 mg Stilboestrol 50 Tage lang entweder parenteral oder peroral. Dabei kam es zu degenerativen Gewebsveränderungen und Nekrosen u. a. in Leber und Niere. Bei Mäusen verursachten 5 mg pr. Gramm Maus bei peroraler Eingabe den Tod im Laufe einer Stunde, wobei es Hypertrophie und dunkelbraune Verfärbung der Nebenniere mit starker kapillarer Dilatation in der Rinde sowie Hämorrhagien gab. Bei Kaninchen kam es nach intravenöser Injektion von 40—50 mg Stilboestrol pr. kg Kaninchen zu starken Krämpfen, welche nach  $\frac{1}{2}$ —2 Minuten zum Tode führten.

Die hier erwähnten toxischen Wirkungen kommen freilich nur nach Eingabe von relativ sehr grossen Dosen der synthetischen oestrogenen Stoffe zustande. Es dürfte jedoch interessant sein zu untersuchen, ob diese Stoffe auch nachweisbare toxische Veränderungen hervorrufen, wenn sie in kleineren

Dosen eingegeben werden, welche sich besser mit den therapeutisch angewandten Dosen vergleichen lassen, sowie ob die natürlich vorkommenden oestrogenen Hormone, wenn sie in derselben Dosierung angewandt werden, eine entsprechende Wirkung haben. Es wurden daher eine Reihe Versuche an Ratten und Meerschweinchen ausgeführt.

Zu den Rattenversuchen wurden kastrierte Rattenweibchen von ca. 150 g Gewicht benutzt. Die orale Eingabe ging mit der Magensonde vor sich, die parenterale subkutan. Während des Versuches wurden die Tiere mit wöchentlichen Zwischenräumen gewogen, und unmittelbar nachdem die Zufuhr der oestrogenen Stoffe aufgehört hatte, wurden die Tiere getötet und sezziert. Es wurden histologische Präparate von der Leber hergestellt und in mehreren Fällen auch eine Reihe anderer Organe histologisch untersucht. Die Leber wurde mittels Hämatoxylin-Eosinfärbung, Sudanfärbung und Glykogenfärbung untersucht. Folgende Rattenversuche sind ausgeführt worden:

*Tabelle 3.*

1)	5	Ratten erhalten	14	Tage lang	täglich	oral	1	mg	Oestrone	
	5	»	»	14	»	»	»	1	»	Dinoestrol
	5	Kontrolltiere.								
2)	4	Ratten erhalten	5	× wöchentl.	5	Wochen lang	subk.	0,5	mg	Oestradiol-Benzol
	2	»	»	5	»	»	oral	0,1	»	Oestrone
	1	»	»	5	»	»	»	0,125	»	Oestrone-Glukosid
	3	»	»	5	»	»	»	0,1	»	Dinoestrol
	2	»	»	5	»	»	»	0,25	»	Stilboestrol
	6	Kontrolltiere.								
3)	2	Ratten erhalten	14	Tage lang	täglich	oral	0,1	mg	Oestrone	
	2	»	»	14	»	»	subk.	0,1	»	Oestrone
	2	»	»	14	»	»	oral	0,1	»	Dinoestrol bzw. Stilboestrol
	2	»	»	14	»	»	subk.	0,1	»	Dinoestrol
	2	»	»	14	»	»	oral	0,5	»	Dinoestrol
	2	»	»	14	»	»	subk.	0,5	»	Dinoestrol
	4	Kontrolltiere.								

Die Toxizität der oestrogenen Stoffe wurde auch an kastrierten weiblichen Meerschweinchen mit einem Durch-



schnittsgewicht von ca. 400 g geprüft (s. Tabelle 4), welche nach Abschluss des Versuches auf dieselbe Weise wie die Ratten untersucht wurden.

*Tabelle 4.*

5 Meerschweinchen erhalten	30	Tage	lang	täglich	1	mg	Dinoestrol
5           "                  "	30	"	"	"	1	"	Oestrone-Glukosid
5           "                  "	30	"	"	"	0,5	"	Oestrone
1 Kontrolltier.							

---

Weder in den Ratten- noch in den Meerschweinchenversuchen zeigte sich irgendeine Beeinflussung des Gewichtes oder des allgemeinen Zustandes der Tiere während des Versuches. Histologisch liess sich keine Beschädigung der Gewebe nachweisen, insbesondere nicht in der Leber, deren Glykogen- und Fettgehalt der gleiche war sowohl bei den mit den natürlich vorkommenden, als auch bei den mit den synthetischen Stoffen behandelten Tieren und bei den Kontrolltieren. Es konnte keine Oestroneablagerung in der Leber nach der parenteralen Eingabe nachgewiesen werden, obschon dieser Stoff ja in recht grossen Dosen gegeben worden war.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass weder die natürlich vorkommenden oestrogenen Stoffe noch die synthetischen bei ihrer Anwendung in verhältnismässig weit grösseren Dosen, als sie für die therapeutische Behandlung in Betracht kommen, irgendeine histologische oder in anderer Weise nachweisbare toxische Wirkung gegenüber Versuchstieren haben.

### *Zusammenfassung:*

Die natürlich vorkommenden oestrogenen Stoffe werden im Gegensatz zu den synthetisch hergestellten in der Leber zerstört. Das Verhältnis zwischen der peroralen und der parenteralen Dosis schwankt für die verschiedenen Stoffe und bei den verschiedenen Tierarten in starkem Grade.

Es lassen sich keine toxischen Wirkungen von Oestrone,

Oestradiol, Oestrone-Glukosid, Stilboestrol oder Dinoestrol in einer Dosierung nachweisen, die weit grösser ist als die in der Therapie zur Anwendung kommende.

#### LITERATUR

- Grumbrecht, P. & Loeser, A.*: Exp. Path. u. Pharm. 193, 34, 1939.  
*Huf, E.*: Klin. Wochenschr. 20, 755, 1941.  
*Jacobsen, E.*: U. f. L. 1422, 1938.  
*Kemp, T. & Pedersen-Bjergaard, K.*: U. f. L. 215, 1932; Endokrinologie 13, 456, 1933; Lancet 842, 1937.  
*Lange-Sundermann*: Münch. med. Wochenschr. 1260, 1940.  
*Loeser, A.*: L. f. d. ges. exp. Med. 103, 1939.  
*Moeller-Christensen, E.*: U. f. L. 907, 1941.  
*Pedersen-Bjergaard, K.*: Comp. studies conc. the strengths of oestrogenic substances. Kobenhavn 1939; Arch. Pharm. og Chem. 725, 1940.  
*Stroud, S. W.*: J. Endocrinology 201, 1939.

## EINE MODIFIZIERTE DOMINICI-METHODE ZUR ELEKTIVEN FÄRBUNG DER EOSINOPHILEN ZELLEN IM HYPOPHYSENVORDERLAPPEN\*)

Von P. Fønss-Bech.

(Eingegangen bei der Redaktion am 18. Aug. 1942).

Das Studium der durch verschiedene Einwirkungen hervorgerufenen Veränderungen der eosinophilen Zellen im Hypophysenvorderlappen bei Ratten brachte die Notwendigkeit einer raschen und sicheren Färbemethode zutage. Ein Teil der in der Literatur beschriebenen Methoden ist nämlich recht kompliziert und die Ergebnisse sehr schwankend, auf welchen Umstand schon *Burgdorf*<sup>1)</sup> verwiesen hat. Von den ausgetesteten Methoden muss die von *Sevringhaus*<sup>2)</sup> angegebene hervorgehoben werden, die aber äusserst umständlich ist und deren Ergebnisse ganz von der Differenzierung abhängen, ein Umstand, der sich bei vielen Methoden oft geltend macht. Die gewöhnliche Haematoxylin-Eosinmethode, die in ihrer von *Vilhelm Jensen*<sup>3)</sup> angegebenen Modifikation verwendet wurde, ist zwar sicher und brauchbar, leidet aber an einem Mangel an Kontrasten, indem die Farbe Haematoxylin nicht genügend scharf vom Pikroeosin absticht. Eine von *Dominici*<sup>4)</sup> angeführte Methode zur Färbung der acidophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens, wobei Orange-G-Eosin und Toluidinblau

---

\*) Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterstützung der Firma Alfred Benzon, A/G, Kopenhagen, ausgeführt.

verwendet werden, weist den gleichen Mangel auf wie die Haematoxylin-Eosinmethode, nur ist es hier die Orange-G-Eosinfarbe, die dem Toluidinblau nicht scharf genug gegenübersteht. Es lag daher nahe, eine Kombination dieser beiden Methoden vorzunehmen und anstatt des Orange-G-Eosins Pikroeosin zu verwenden und mit Toluidinblau nachzufärben. Das Ergebnis dieser Kombination erwies sich als befriedigend, weshalb diese Methode in ihren Einzelheiten ausgearbeitet und an Hypophysen von Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen erprobt wurde.

Zum Fixieren der Hypophysen wird Allen'sche Flüssigkeit P. F. A.<sub>3</sub><sup>5)</sup> benutzt, die Fixierdauer für Hypophysen der oben-erwähnten Tiere beträgt 2 Stunden, worauf das Organ 24 Stunden in 70 %igen Alkohol gelegt wird, indem man den Alkohol mehrmals erneuert, danach kommt es 4 Stunden in 80 %igen Alkohol, dann noch 12—18 Stunden in 96 %igen Alkohol und schliesslich wird es durch absoluten Alkohol und Xylol in Paraffin eingebettet.

Die so gehärteten und eingegossenen Hypophysen werden in Schnitte von je 3  $\mu$  zerlegt, die nach Auftragung auf den Objektträger im Thermostat bei 35° durch 24 Stunden getrocknet werden.

Die Schnitte werden nun mittels Xylol entparaffiniert und durch Alkohol in destilliertes Wasser gebracht, indem man 2 Gläser mit Xylol, 2 Gläser mit absoluten Alkohol und 1 Glas mit 96 %igem Alkohol, sowie 1 Glas mit destilliertem Wasser verwendet; die Schnitte werden in jedem Glas 2 Minuten lang behandelt. Aus dem Wasser gelangen die Schnitte in Pikroeosin<sup>3)</sup>, worin sie 3 Minuten lang bleiben, worauf sie nach rascher Spülung in destilliertem Wasser für 5 Minuten in eine 0,05 % ige wässrige Lösung von Toluidinblau kommen; diese Zeiten müssen sehr genau eingehalten werden. Die Schnitte werden nun so lange in destilliertem Wasser gespült, bis keine Farbwolken mehr abgehen, und dann rasch durch Alkohol in Xylol geleitet, indem man die gleiche Anzahl Stufen einhält wie bei der Entparaffinierung; die Schnitte

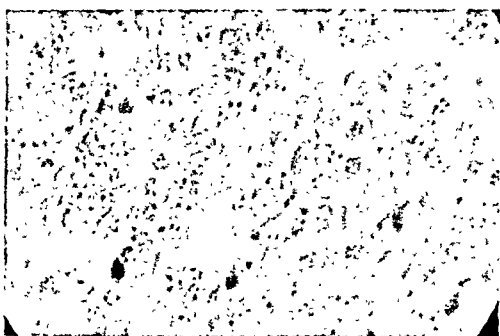
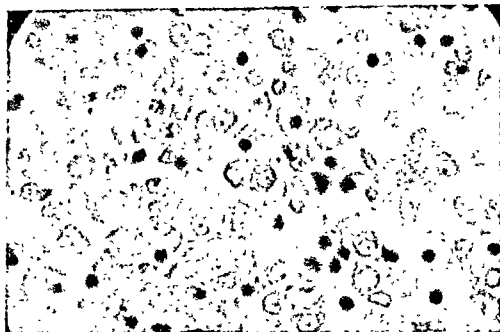
werden jedoch längstens 5 Sekunden in jeder Flüssigkeit behandelt.

Das Ergebnis der Färbung (siehe Tafel) sind rote acidophile Zellen, dunkelblaue basophile Zellen und schwach hellblaue chromophobe Zellen, während die Blutkörperchen rot-orange gefärbt sind.

Wie man aus der Beschreibung erschen kann, ist die Methode ausserordentlich rasch und erfordert keine Differenzierung, weshalb man sowohl bei Einzel- wie bei Serienfärbungen dasselbe Resultat erreicht. Um die Verwendbarkeit der Methode bei pathologischen Zuständen zu erproben, wurden auch Probefärbungen mit anormalen Hypophysen vorgenommen, ebenfalls mit befriedigenden Ergebnissen.

#### LITERATUR.

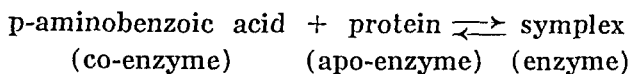
- 1) *Burgdorf, A. L.*: Endokrinologie 16 (1936) 148—160.
- 2) *Sevringhaus, A. E.*: Anat. Rec. 53 (1932) 1—5.
- 3) *Jensen, Vilhelm*: Hosp. Tid. 1924, 659—660.
- 4) *Romeis, B.*: Taschenbuch d. Mikroskopischen Technik. Berlin 1922, 116.
- 5) *McClung, C. E.*: Handbook of Microscopical Technique, New York 1922, 424.



Hypophysenvorderlappen von Ratten, gefärbt nach Dominici,  
modifiziert Fonss-Bech.

*P. Brandt*<sup>6)</sup>, it is mentioned that the effect of this substance is not neutralized by p-aminobenzoic acid as is that of the typical sulfonamides. The same observation has been made by *Schreus*<sup>13)</sup>, simultaneously with, and independent of, our studies. In addition, we found that the effect of this substance is not neutralized either by the corresponding benzoic acid — p-(aminomethyl)-benzoic acid — nor by vitamin B<sub>1</sub> or nicotinic acid amide.

The bacteriostatic effect of the sulfonamides, we think, must be assumed to be due to the circumstance that these substances inhibit the combination of p-aminobenzoic acid with a protein, together with which it forms an enzyme necessary to the bacterial growth:<sup>4)</sup>



As the growth-inhibiting effect of p-(aminomethyl)-benzenesulfonamide is not neutralized by p-aminobenzoic acid, we have to assume that the action of this substance is fundamentally different from that of the typical sulfonamides. This assumption has been confirmed through a number of experiments in vitro which will be reported here.

### 1. *Effect of p-(Aminomethyl)-benzenesulfonamide on Bacteria Differing in Resistance to the »Ordinary« Sulfonamides.*

Pneumococcus strains differ greatly in resistance to the sulfonamides<sup>9)</sup>, and this difference is seen most easily in vitro. Certain strains are primarily resistant, but it is practicable also by cultivation in sulfonamide-containing broth to increase the resistance of sensitive strains. Thus a pneumococcus strain of Type 1 has been made strongly resistant to sulfapyridine by cultivation in 13 passages in serum broth with increasing sulfapyridine concentration. Such a strain acquires at the same time a higher resistance (than that of the mother strain) to the other sulfonamides. Meningococci<sup>10)</sup> and gonococci<sup>11)</sup> behave in a similar way.

It was of interest now to see whether p-(aminomethyl)-benzenesulfonamide behaved in this respect like the other sulfonamides. An experiment was performed then for comparison of the effect of sulfapyridine, sulfathiazole and p-(aminomethyl)-benzenesulfonamide on the aforementioned sensitive pneumococcus Type 1 and the resistant daughter strain.

Corresponding to each of the three substances, series of dilutions in serum broth were made: 1:5000, 1:10 000, 1:20 000, and so on. These dilutions were pipetted into test tubes, 5 cc. in each tube, two series of tubes for each of the three drugs. One series was inoculated with the sensitive strain, the other with the resistant strain (for details of the technique, see previous papers<sup>5, 6</sup>). The inoculum consisted in 0.05 cc. of a 12-hour culture diluted 1:2000 with broth. The inoculum of the sensitive strain contained 750 bacteria, that of the resistant strain 1000 bacteria. After incubation for 24 hours it was noted which tubes had become turbid, and which ones had kept clear.

The findings are recorded in Table 1.

Table 1.

*Effect of Sulfapyridine, Sulfathiazole and p-(aminomethyl)-benzenesulfonamide on a Sensitive Pneumococcus Strain and a Strain with experimentally increased Resistance to Sulfapyridine.*

Concentration	Sulfapyridine		Sulfathiazole		p-(aminomethyl)-benzenesulfonamide	
	Resistant strain	Sensitive strain	Resistant strain	Sensitive strain	Resistant strain	Sensitive strain
1:5000	(+)	—	—	—	—	—
1:10,000	+	—	—	—	—	—
1:20,000	+	—	—	—	—	—
1:40,000	+	+	+	—	+	+
1:80,000	+	+	+	—	+	+
1:160,000	+	+	+	—	+	+
1:320,000	+	+	+	+	+	+

Explanation of symbols: — clear broth; (+) slightly turbid broth; +: opaque broth.



From Table 1 it will be noticed that the bacteriostatic effect of sulfapyridine and sulfathiazole was considerably weaker on the resistant strain than on the sensitive, and that the effect of sulfathiazole was about eight times stronger than that of sulfapyridine, irrespective of the resistance of the strain. On the other hand, *p*-(aminomethyl)-benzenesulfonamide had just as strong a bacteriostatic effect on the resistant strain as on the sensitive.

MacLeod<sup>8</sup>) has shown that a pneumococcus strain with experimentally increased resistance form more sulfonamide-inhibiting substance than do the sensitive strains. As this inhibitory substance undoubtedly is *p*-aminobenzoic acid, and as *p*-(aminomethyl)-benzenesulfonamide is not inhibited by this substance, it seems more likely that here we have the explanation why *p*-(aminomethyl)-benzenesulfonamide is equally effective against the two strains.

Staphylococci are rather slightly susceptible in vitro to the action of the ordinary sulfonamides, and their resistance is undoubtedly due in part to production of inhibitory substan-

Table 2.  
*Effect of Sulfathiazole and p*-(Aminomethyl)-benzenesulfonamide on *Staphylococcus Aureus*.

Concentration	Sulfathiazole		<i>p</i> -(aminomethyl)-benzenesulfonamide	
	Growth in broth	Subculture on blood agar	Growth in broth	Subculture on blood agar
1:1000	(+)	+++	—	0
1:2500	(+)	∞	—	0
1:5000	+	∞	—	+
1:10,000	+	∞	—	+++
1:20,000	+	∞	+	∞

Explanation of culture results in broth: —: clear broth; (+) slightly turbid broth; +: opaque broth.

Explanation of subculture results on blood agar: 0: no growth; +: 1–10 colonies; ++: 10–100 colonies; +++: 100–500 colonies; ∞ confluent growth.

ces. Against this bacterial species p-(aminomethyl)-benzene-sulfonamide proves distinctly superior to the ordinary sulfonamides, as is evident from Table 2. The experiment here recorded was carried out with a pemphigus strain (Staph. aureus). Inoculum: about 20,000 bacteria. Culture medium: 5 % serum broth. The tubes were read after incubation for 24 hours, and then subcultures were made from each tube on blood agar with a platinum loop.

While sulfathiazole concentration at 1 : 1000 and 1 : 2500 did not prevent a slight growth in broth and the appearance of numerous colonies on blood agar, the growth of the organism was inhibited completely by p-(aminomethyl)-benzene-sulfonamide in concentrations of 1 : 5000 and 1 : 10,000.

## 2. Bacteriostasis in p-(Aminomethyl)-benzenesulfonamide-containing Broth.

When sulfapyridine-containing broth is inoculated with a suitable small amount of pneumococci and the growth at 37° is followed by subcultivation on blood agar at intervals of a couple of hours, it will be seen that in the first 4—6 hours the growth proceeds with about the same intensity as in the control tube, which contains no chemotherapeutic; not until then does the number of bacteria begin to decrease gradually. A corresponding phenomenon is observed in experimentally infected animals.<sup>9)</sup>

This initial phase of growth («lag» phenomenon) is characteristic of the ordinary sulfonamides: sulfanilamide, sulfapyridine, sulfathiazole and others.

With slowly growing bacteria this initial phase of growth is of considerably longer duration; for *Brucella abortus*, for instance it lasts several days.<sup>3)</sup> In a previous work<sup>9)</sup> this phenomenon has been investigated fairly thoroughly, and the initial growth was found not to be due to any change in the culture medium (consumption of certain elements, accumulation of toxic substances) but to a gradual change in the bacteria themselves. If the growth was inhibited by placing

the tube in refrigerator at 6° C, the initial phase of growth failed to appear, and the number of bacteria kept practically unchanged for 24 hours. It was of interest now to see whether *p*-(aminomethyl)-benzenesulfonamide would behave like the other sulfonamides in this respect.

A tube containing 10 cc. of 5 % serum broth + *p*-(amino-methyl)-benzenesulfonamide in a concentration of 1:5000 was inoculated with 0.2 cc. of a pneumococcus Type 1 culture diluted 1:20 000. After mixing, 0.1 cc. of this culture was spread on a blood agar plate, and similar subcultures were made after incubation at 37° for 4, 6, 10, 12, and 24 hours; the resulting colonies were counted. The same procedure was carried out with another tube, but here the culture was kept in refrigerator at 6° C.

The outcome of this experiment is recorded in Table 3. For the sake of comparison, a similar experiment with sulfapyridine is cited from a previous work.<sup>9)</sup>

Table 3.

*Effect of p-(Aminomethyl)-benzenesulfonamide and Sulfapyridine on the Course of the Growth of Pneumococci.*

*p*-(Aminomethyl)-benzenesulfonamide (1:5000) in Serum Broth.

	37°	6°
0 hours	180 colonies	145 colonies
4    »	135    »	153    »
6    »	81     »	131    »
10   »	48     »	148    »
12   »	31     »	124    »
24   »	29     »	133    »

Sulfapyridine (1:5000) in Serum Broth.

	37°	6°
0 hours	32 colonies	48 colonies
6    »	750    »	41    »
12   »	2     »	38    »
24   »	0     »	30    »

These findings show that *p*-(aminomethyl)-benzenesulfonamide is able to reduce the number of bacteria at once,

*i. e., without any initial phase of growth.* Like sulfapyridine, the substance appears to have no effect at 6°.

Several similar experiments, but with larger and smaller inocula, have given substantially the same result. With large inocula the bacteria are killed more slowly than with small.

### 3. Effect of *p*-(Aminomethyl)-benzenesulfonamide on a Large Inoculum and a Small.

As shown by several authors, the effect of sulfanilamide, sulfapyridine and other sulfonamides in vitro is largely dependent on the size of the inoculum.<sup>1,9</sup> The effect on large inocula is much weaker than that on small inocula. In this respect too, *p*-(aminomethyl)-benzenesulfonamide was found to differ from the other sulfonamides.

Table 4 gives the findings in an experiment carried out for comparison of the effect of sulfathiazole and of *p*-(aminomethyl)-benzenesulfonamide on a small inoculum of pneumococci and on a large one. The inocula contained respectively 250 pneumococci and 19 million pneumococci per 5 cc. of serum broth. The findings after incubation for 24 hours are given in Table 4.

Table 4.

*Effect of Sulfathiazole and p*-(Aminomethyl)-benzenesulfonamide in vitro on Large and Small Inocula of Pneumococci.

Concentration	Sulfathiazole		<i>p</i> -(aminomethyl)-benzenesulfonamide	
	350 pneumococci	19 million pneumococci	350 pneumococci	19 million pneumococci
1:5000	—	+	—	—
1:10,000	—	+	—	—
1:20,000	—	+	—	+
1:40,000	—	+	+	+
1:80,000	—	+	+	+
1:160,000	—	+	+	+
1:320,000	+	+	+	+

As will be noticed, sulfathiazole has a far greater effect on a small inoculum than on a large one, whereas the effect of p-(aminomethyl)-benzenesulfonamide is practically the same on the two inocula. Still, the subcultures from the p-(aminomethyl)-benzenesulfonamide-containing tubes infected with a large inoculum showed a dense growth of pneumococci — as was to be expected after the cultivation experiment described in the preceding section. When even the stronger sulfathiazole broth yielded a dense growth of pneumococci, this is undoubtedly attributable to the initial phase of growth, during which the bacterial density reaches such a stage that the broth becomes opaque.

*Domagk*<sup>2)</sup> has found that the bacteriostatic effect of p-(aminomethyl)-benzenesulfonamide in vitro on various anaërobics is considerably stronger than that of sulfathiazole and sulfathiodiazole, whereas *Schreus*<sup>12)</sup> has found sulfathiazole and sulfaisopropylthiodiazole are considerably more potent than p-(aminomethyl)-benzenesulfonamide. This divergence is easily explained if *Domagk* worked with large inocula and *Schreus* with small ones.

### Discussion.

These experiments have shown that p-(aminomethyl)-benzenesulfonamide has a chemotherapeutic effect of a fundamentally different character from that of the other sulfonamides: the effect of this substance is not neutralized by p-aminobenzoic acid; it has the same effect on bacteria with different resistance to the other sulfonamides; the bacteria show no initial phase of growth, and the effect is independent of the size of the inoculum.

The significance of this to the future chemotherapeutic developments cannot yet be estimated, but it is possible that a number of new effective preparations may be derived from p-(aminomethyl)-benzenesulfonamide. The potency of sulfanilamide was increased considerably in the derivatives with

pyridine and, later, thiazole and thiodiazole, but the difference in the effect of these drugs is merely quantitative, not qualitative, and it is hardly possible by introduction of other heterocyclic substituents to obtain substances with an essentially stronger effect.

When the remedies mentioned have proved merely slightly effective or ineffective against a number of infections, no doubt this is largely due to the circumstance that their effectivity is compromised by a sulfonamide-inhibiting substance. As mentioned, bacteria which are resistant to the ordinary sulfonamides form this substance in a particularly high degree, and neutralizing substance is found also in necrotic tissue and pus. These facts afford an adequate explanation of the relatively slight effect of these remedies in lesions associated with accumulation of pus (empyema and abscesses), endocarditis and tuberculosis. As *p*-(aminomethyl)-benzenesulfonamide is not neutralized by *p*-aminobenzoic acid, it may be that this substance (or derivatives of it) will prove effective against such lesions — that is, if there be no substances in the infected organism that will inhibit the action of *p*-(aminomethyl)-benzenesulfonamide.

So far, *p*-(aminomethyl)-benzenesulfonamide has been employed clinically only to such a slight extent that it would be impossible to say anything about its therapeutic value.

As the growth-inhibiting effect of the substance is not particularly great, it will be highly interesting to ascertain whether its effect may be increased by the introduction of heterocyclic substituents as in sulfanilamide.

#### *Addendum by Ole Christensen and J. K. Poulsen:*

We have examined the effect of *p*-(aminomethyl)-benzenesulfonamide on tubercle bacilli in the following way:

Test tubes containing Löwenstein's medium + *p*-(aminomethyl)-benzenesulfonamide in concentrations from 1 : 1000 down to 1 : 320 000 were inoculated with  $10^{-4}$  mg tubercle

bacilli of human type. After incubation for one month at 37° C. the tubes showed the following number of colonies:

Concentration	Number of colonies in 5 tubes.				
1 : 1000	7	—	21	—	13 — 14 — 12
1 : 2000	5	—	5	—	6 — 2 — 16
1 : 5000	10	—	23	—	17 — 2 — 4
1 : 10 000	9	—	9	—	6 — 8 — 8
1 : 20 000	8	—	10	—	12 — 1 — 0
1 : 40 000	11	—	13	—	5 — 0 — 2
1 : 80 000	15	—	4	—	2 — 2 — 8
1 : 160 000	4	—	6	—	11 — 7 — 10
1 : 320 000	1	—	10	—	1 — 7 — 6
controls	9	—	5	—	13 — 4 — 2

This shows that under the mentioned conditions p-(aminomethyl)-benzenesulfonamide has no inhibiting effect on the tubercle bacillus employed.

#### REFERENCES.

1. Colebrook, L., Buttle, G. A. H. & O'Meara, R. A.: *Lancet* 2: 1323, 1936.
2. Domagk, G.: *Klin. Wchnschr.* p. 448, 1942.
3. Green, H. N.: *Brit. J. Exper. Path.* 21: 38, 1940.
4. Jensen, K. A. & Schmith, K.: *Kemisk Maanedssblad* 5: 73, 1942.
5. — *Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap.* 102: 261, 1942.
6. Jensen, K. A. & Schmith, K. & Brandt, P.: *Klin. Wchnschr.* p. 1042, 1942.
7. Klarer, J.: *Klin. Wchnschr.* 20: 1250, 1941.
8. Miller, E., Sprague, J. M., Kessinger, L. W. & Burney, L. F.: *J. Amer. Chem. Soc.* 62: 2099, 1940.
9. Macleod, C. M.: *J. Exper. Med.* 72: 217, 1940.
10. Schmith, K.: *Experimental Studies on the Effect of Sulfapyridine on Pneumococci and Gonococci.* Copenhagen 1941. *Nord. Med.* 8: 2211, 1940.
11. — *Nord. Med.* 13: 91, 1942.
12. Schmith, K. & Reymann, Fr.: *Nord. Med.* 8: 2500, 1940.
13. Schreus, H. Th.: *Klin. Wchnschr.* p. 1233, 1941.
14. — *Klin. Wchnschr.* p. 671, 1942.

## ON THE MOTILITY OF FUSOBACTERIUM.

By *Johs. Boe*, M.D.

(Received for publication Dec. 3rd, 1942).

A highly disputed question which has contributed not a little in making the classification of this group of bacteria uncertain and unsatisfactory is the question as to whether these bacteria are motile or not.

Originally *H. Vincent* (1896) described the bacteria he found as immotile. Later, however, he states that it could be motile when examined in absolutely fresh preparations. In most text books up to recent times, however, Vincent's first assumption has been set forth, and *Fusobacterium* is described as immotile. Many authors have studied this group of bacteria carefully and agree on this point.

Of the earlier investigators we can mention *P. Mühlens* and *M. Hartmann* (1906), *E. Ellermann* (1907) and *Charles Krumwiede* and *Josephine Pratt* (1913). And among more recent investigators we can mention *Maximilian Knorr* (1922), *I. Pilot* and *J. Brams* (1923), *Philip L. Varney* (1927), *A. Alessandrini* and *E. J. Pampana* (1928), *Sverre Dick Henriksen* (1936), *Maynard K. Hine* and *George Packer Berry* (1937) and *Heinrich Dicker* (1938). These authors have not, either in direct preparations from the pathological process or in cultures been able to detect any kind of movement.

On the other hand there are many investigators who definitely claim that there are motile forms of this bacteria, even though all are not motile. Of those investigators who have demonstrated



motility in fusiform rods the following can be mentioned: *J. Bernheim* and *D. Popischill* (1898), *Graupner* (1902), *D. Veszpremi* (1907), *Karl Leiner* (1907), *S. Costa* (1907—1911), *H. C. Plaut* (1917), *Ruth Tunnickliff* (1923), *G. Sanarelli* (1927), *P. Mühlens* (1930), *Eugenia Stoilowa* (1938) and *W. N. Kazeff* (1939).

But there is much disagreement here. Some have found slow, oscillating movement, and then only in fresh preparations. Others have seen very rapid movement, thus *P. Mühlens*, and *Canot* and *Fournier* (cit. *Weinberg*, *Nativelle* and *Prevot*), and *David T. Smith* (1932), who in his types I and II of *Fusobacterium* finds active motility, says that type III is immotile. It is usually claimed that the bacteria lose their motility on artificial media, but some have also found motility in pure cultures.

It was natural that an attempt was made at solving the problem of the bacterium's motility by trying to demonstrate flagella. *Graupner* (1902) found peritrichous flagella in his bacteria. Flagella have also been demonstrated by *H. C. Plaut* (1917), *P. Mühlens* (1930) *E. Stoilowa* (1938) and *W. N. Kazeff* (1939). The flagella are usually described as peritrichous, but of a different type than the usual flagella. These stain better, vary greatly as to thickness and are often thicker at the attached than at the free end. Some investigators, as for example *David T. Smith* who has worked with motile strains, have never been able to demonstrate flagella.

Thus it is obvious that there is still uncertainty about this problem. Experienced investigators hold to their views on both sides of the question.

### *Personal Examinations.*

During the first year of work with these bacteria we had never once observed motility, either in samples from the pathological process or from the cultures. And it was our decided impression that these microbes were immotile. But as the literature is so full of contradictions on this point, and as the question is of significance for the classification of this group of bacteria, we made it the object of a special examination.

#### a. Examinations on Motility.

All of our 30 strains of *Fusobacterium* (*Johs. Boe*, 1941) were examined in fresh preparations after mounting the pre-

parations so that all movement of the fluid was stopped, without exposing it to oxygen or cooling. The cultures were examined as early as possible, as soon as the first trace of growth was visible.

Instead of mounting the preparations under a cover glass, we often used hanging drops, but this gave the same results.

Many claim that examination of only slightly motile microbes is best made by microscoping the culture in a capillary tube (*Weinberg, Nativelle and Prevot*). This technique was also used, both with round capillary tubes, such as are made by drawing out Pasteur pipettes and melting the ends together, and with flattened capillary tubes which, according to *W. S. Sturges* (1928), have certain advantages. We found no motility with any of these methods. Moreover it was difficult to discern any advantages of these methods over the usual examination under a cover slip sealed with vaseline.

We examined both solid and fluid cultures, cultures on rich media such as the *Noguchi* medium, and on relatively poor media such as cysteine glucose broth. The results was always negative. Lively molecular movement was often seen, but nothing which could be interpreted as active motility. Examinations of the same cultures in a perfect dark field always gave the same result.

In numerous experiments with mice we injected the cultures intraperitoneally in lethal doses, so that the bacteria multiplied. The animals were killed and the preparations examined immediately, before it was possible for cold, oxygen and other external factors to exert any influence. But here also it was impossible to detect any movement.

Afterwards we examined in the same manner a number of preparations from the normal oral cavity and from pathological processes where *Fusobacterium* could be demonstrated. No motility was observed. When, for example, a preparation from a gingivitis is examined, a tremendous variety of bacteria will be seen in a good dark field, and there is occasion to observe all kinds of movements, from the most

lightening speed to the slow swinging movements of the large, stiff rods. In the same dark field one may see spirochetes, spirilla and vibrio. But *Fusobacterium*, which is always easy to recognize after some practice, is always absolutely immotile, even though only a second or two have passed from the time the sample was taken until it is in focus.

It was thus our decided impression that all of the strains of *Fusobacterium* we have worked with, whether in culture, in experimental lesions or in pathological processes, were absolutely immotile.

#### b. Demonstration of Flagella.

As so many investigators have demonstrated flagella which with more or less certainty belong to the group of »fusiform rods«, we also tried flagella staining with our immotile strains. This was logical because some investigators (*W. N. Kazeff*) have demonstrated flagella in *Fusobacterium* without being able to demonstratemotility. And *Kazeff* concludes from his findings that when the bacteria have flagella, they must be motile.

#### *Technique.*

Flagella staining is capricious, and staining *Fusobacterium* in this manner involves greater difficulties than usual because it is more difficult to obtain good cultures. Much of the disagreement on this question is certainly due to the technique used. We therefore record in detail the technique we used:

1. The slides were prepared very carefully: first they lay 24 hours in a potassium bichromate sulphuric acid solution. Thereafter they were rinsed over and over again with water. They were then covered with 96 % alcohol to which 15 drops of concentrated  $\text{NH}_3$  had been added to 50 cc. alcohol and dried with filter paper (the slides were only handed with a pincette). After drying, the slides were placed on a copper plate over a gas flame for one hour. When the slides were

so clean that a drop of water spread out over them like a thin membrane, they were good enough to be used.

2. The culture were young cultures from soft ascitic fluid agar plates and from blood agar plates. The cultures were used as soon as growth was visible, as a rule between 16—24 hours. A little of the culture was taken very carefully with a loop and dipped in a tube with 0,5 cc. distilled water. Usually we inoculated 12 such tubes at a time. It was difficult to obtain good preparations from some of the tubes, while from others, which were apparently treated in exactly the same way, it was much easier. The 12 tubes were then placed in a thermostat for  $\frac{1}{2}$  hour. Thereafter a loopful of the culture was taken very carefully and touched against the slide. When the drop of culture had spread out like a membrane, the slides were placed in a thermostat to dry.

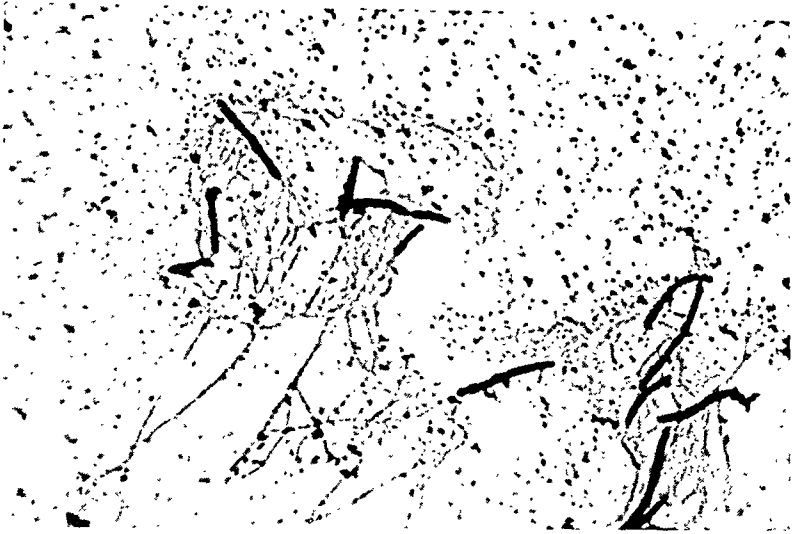
3. Staining. When the slides were completely dry they were treated as follows, which is practically the same as *Nicolle* and *Morax*' modification of *Löffler's* method:

Under slight heating the slides were treated three times in the following solution:

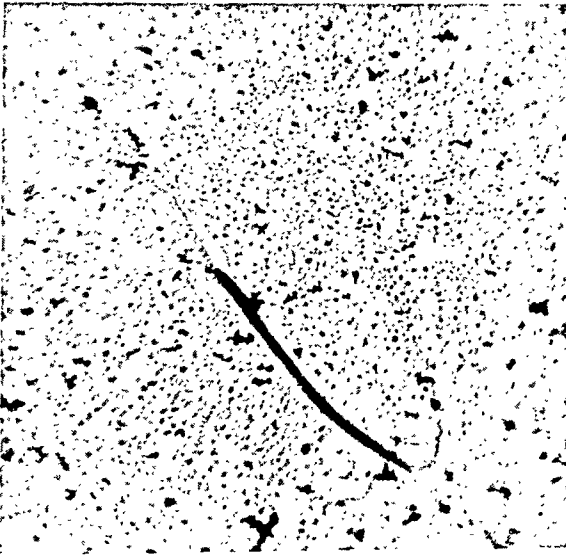
Tannic acid solution 25 %	150,—
Saturated iron sulphate solution	75,—
Saturated alcoholic solution of fuchsine	15,—

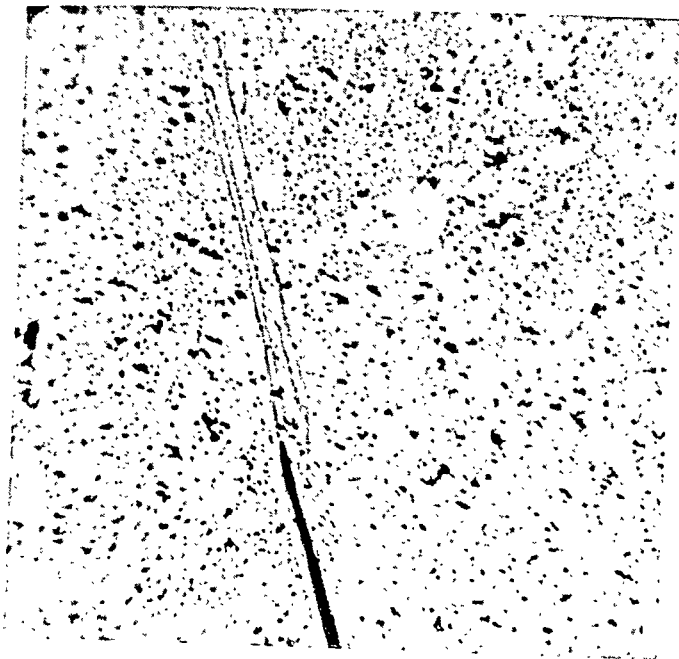
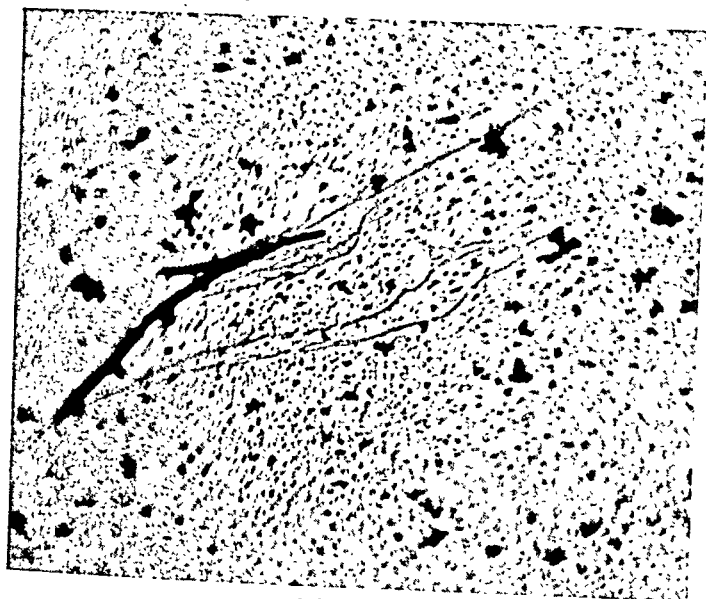
This was followed by a thorough rinsing in water. The preparations were then stained with safranin or with strong phenol fuchsine. We often had very good preparations when both of these stains were used, first safranin and then phenol fuchsine with slight heating. After staining the preparations were rinsed with water, dried in the air and mounted in balsam.

With this method we got good uniform results. To our surprise we found that our strains had flagella. We examined one strain after another and always with the same result. All of them had flagella but they were more difficult to demonstrate in some than in others, where flagella were found as easily as in *Proteus*. We finally demonstrated flagella in

*Fig. 1.*

all of the strains we had isolated, also in strains which are identical with *Fusobacterium nucleatum*, which all investigators agree is immotile.

*Fig. 2.*

*Fig. 3.**Fig. 4.*

The short forms were peritrichous (Fig. 1). The long forms were usually peritrichous but sometimes the flagella seemed to be assembled at the ends (figs. 2 and 3), either in pairs or in tufts which emanated from the point or the region immediately adjacent to it (Fig. 4).

The flagella have, as the pictures show, the same appearance as in a typical flagellar microbe, e. g. *Proteus*. They are very long, and it often seemed that they were thinner and more delicate than the flagella of *Proteus*, and they were much more fragile. In any case they seemed relatively thin in comparison to the massive, stiff bacteria.

As mentioned above it was often more difficult to find the flagella in *Fusobacterium* than in *Proteus* for example, it was necessary to hunt longer as the majority of the bacteria in the preparation had no flagella. But in our examination of the smooth — rough variation of the strains (dissociation) it became clear that it was much easier to find flagella in rough cultures than in smooth. It was possible to find microbes with so many fine flagella in every field that the picture resembled that of a *proteus* culture.

Naturally all of *the same* cultures which were used for flagella staining and where flagella were demonstrated, were also examined for motility by all the methods mentioned above. But no motility was detected in any of these cases.

### *Discussion.*

Since the term »fusiform rods« has only been a morphological term, it is natural that some bacteria species which do not belong in this group have been described in this manner. It is very probable that some of the motile fusiform rods described have really been *Spirilla*. These are often found in the same processes where *Fusobacterium* is found. And as they die motility ceases, and they often become straighter and may easily be confused with *Fusobacterium*. A very slow, barely visible movement is then seen. It is reasonable to believe, when one has seen this phenomenon, that some of the

fusiform rods which have been described as slowly moving fusiformis, are these mouth spirilla.

As for the actively motile fusiform rods which have been described, a number of these have undoubtedly belonged to the *Vibrio*. The morphological difference is not always so pronounced, and lies mostly in size difference when *Vibrio* has the slightly bent and pointed form. The distinction between the true spirilla and vibriones is also rather vague.

But even though mistakes of this nature have been frequent and, to a great extent have their explanation in the uncertain limitations of this group, it seems that motility has been demonstrated in bacteria which probably belonged *Fusobacterium*, but we have never found motility in any of our strains.

It is reasonable to believe, judging from the literature and our own investigations, that we are concerned with a very large group of bacteria, with considerable morphological variation and with all the transitional forms between the different types. It must be regarded as proven that this entire group of bacteria has flagella, even when they are immotile. It also seems certain that the immotile forms are the rule and the motile forms are the exception, if they exist at all.

It must be justified to regard the above mentioned animal experiments as significant in this respect. In these cases where the microbes multiplied rapidly in the animal organism, one would expect to find motility when the examination was made under optimum conditions.

It is also difficult to answer the question as to whether motility has any relation to the variation, eventually dissociation, of the bacteria. The findings we have made, that pure rough cultures have more flagella than smooth cultures, point in that direction. But it must be emphasized that in both cases our microbes were immotile.

It is easier to understand that the long forms of *Fusobacterium* are immotile. The relatively large, stiff bacteria body seems tremendous in comparison to the fine flagella, and if it is permissible to judge by macroscopical standards,



it seems reasonable that motility is minimal or entirely lacking.

That the flagella of these bacteria have some other purpose than locomotion is possible, and examinations like those of W. N. Kazeff may possibly be interpreted in this manner.

On the other hand it is certainly wrong to conclude as Kazeff has done, that when the bacteria have flagella they are motile.

From the evidence presented here it does not seem rational to use motility in these bacteria as a characteristic by which they can be classified as A. R. Prevot (1938) has done.

He sets up two genera: the immotile forms as *Fusiformis* and the motile forms as *Fusocillus*. While the first group now begins to be relatively well defined, there is great confusion among the motile forms. And this situation is not helped by the fact that the first species in this genus is *Fusocillus shmamini* (Shmamini), a microbe which is so poorly described in the original publication that it is impossible to recognize it.

The principle of Bergey and co-workers (1939) is more firmly founded. They describe all species *Fusobacterium* as immotile. Motility is not used as a basis for classification, and they leave open the question as to whether the described fusiform rods really belong to *Fusobacterium* or not. This agrees much better with the facts as they are known at present.

### Summary.

1. The most careful microscopic examination showed that the thirty strains of *Fusobacterium* which are studied in the present work are immotile. This is true of material from pathological processes and from experimental infections where the bacteria multiplied abundantly. It is also the case in all cultures, in the youngest cultures and on the richest media.
2. It was demonstrated that all of our strains of *Fuso-*

bacterium had flagella. These flagella were very long and thin, and were extremely fragile, much more so than those found in *Proteus*. It was necessary to exercise great care in preparing them. It was much easier to find flagella in »R« colonies than in »S« colonies.

3. In many cases where motile bacteria belonging to *Fusobacterium* have been described, there has certainly been confusion with spirilla species, a mistake which is very easy to make.

We are dealing with a large group of bacteria which have flagella. It is possible that these flagella have some other function than locomotion. In any case the large majority of strains is undoubtedly immotile.

With our present knowledge of these bacteria we cannot use motility as a basis for classification.

4. In the short forms of *Fusobacterium*, peritrichous flagella were found. When the bacteria were long and thread formed the flagella were assembled at both ends.

## LITERATURE

- Alessandrini, A. et E. J. Pampana*: Compt. rend. Soc. biol. 1923: 98: 1383.
- Bergey, David H.*: Determinative Bacteriology. London 1939.
- Bernheim, J. und D. Popischill*: Jahrb. Kinderheilk. 1898: 46: 434.
- Boc, Johs.*: *Fusobacterium*. Studies on Its Bacteriology, Serology and Pathogenicity. Skr. utg. Det Norske Videnskaps-Akademi i Oslo. 1. Mat. Naturv. Kl. 1941 No. 9.
- Costa, S.*: Compt. rend. Soc. biol. 1909: 67: 317, 865 and 866.  
 — Compt. rend. Soc. biol. 1910: 68: 199 and 200.  
 — Compt. rend. Soc. biol. 1911: 70: 814.
- Dicker, Heinrich*: Zbl. Bakt. I. Orig. 1938: 141: 37.
- Ellerman, E.*: Zeitschr. Hyg. 1907: 56: 453.
- Graupner*: Münch. med. Wschr. 1902: 49: 727.
- Henriksen, Sverre Dick*: Studies on the Bacterial Flora of the Respiratory Tract. Skr. utg. Det Norske Videnskaps-Akademi i Oslo. 1. Mat. Naturv. Kl. 1936 No. 11.
- Hine, Maynard K. and George Packer Berry*: J. Bact. 1937: 34: 517.
- Kazeff, W. N.*: J. Bact. 1939: 38: 103.
- Knorr, Maximilian*: Cbl. Bact. I. Orig. 1922: 89: 4.

- Krumwiede, Charles Jr. and Josephine Pratt:* J. Inf. Dis. 1913: 12: 199.
- J. Inf. Dis. 1913: 13: 438.
- Leiner, Karl:* Cbl. Bakt. 1907: 43: 7 and 119.
- Mühlens, P.* in: *Kolle, Kraus, Uhlenbuth:* Handb. d. path. Microorg. Jena, Berlin u. Wien 1930. Bd. VII, 2.
- Mühlens, P. und M. Hartmann:* Zeitschr. Hyg. 1906: 55: 81.
- Pilot, I. and J. Brams:* J. Inf. Dis. 1923: 33: 134.
- Plaut, Alfred:* Cbl. Bakt. 1917: 83: 537.
- Prevot, A. R.:* Ann. Inst. Pasteur. 1938: 60: 285.
- Sanarelli, G.:* Ann. Inst. Pasteur. 1937: 41: 1 and 679.
- Smith, David T.:* Oral Spirochetes and Related Organisms in Fusospirochetal Disease. London 1932.
- Stoilowa, Eugenia:* Zbl. Bakt. I. Orig. 1938: 141: 379.
- Sturges, W. S.:* J. Bact. 1928: 15: 379.
- Tunnickliff, Ruth:* J. Inf. Dis. 1923: 33: 147.
- Varney, Philip L.:* J. Bact. 1927: 13: 275.
- Veszprémi, D.:* Cbl. Bakt. 1907: 44: 332, 408, 515 and 648.
- Vincent, H.:* Ann. Inst. Pasteur. 1896: 10: 488.

## ON THE RELATION BETWEEN FUSOBACTERIUM AND THE ACCOMPANYING SPIROCHETES.

By *Johs. Bøe* and *Jon Jonsen*.

(Received for publication Dec. 3rd. 1942).

In all of the pathological processes which can be included in the term »fusospirochetosis«, *Fusobacterium* and spirochetes are generally found in more or less equal proportions. Some times one of these bacteria species dominates the picture while the other recedes into the background but this is the exception rather than the rule. And only very rarely does the one appear without the other.

The characteristic microscopic picture of a Plaut-Vincent's angina gives the impression that the two bacteria belong together and this relation is, in ordinary medical parlance, the most commonly used example of bacterial symbiosis. Perhaps bacterial synergism is a better term. But regardless of which term is used both imply that two different microorganisms are involved.

In the earliest descriptions of the bacterial flora in fusospirochetal processes in the mouth (H. C. Plaut 1894, A. Veillon 1894, A. Vincent 1896) the idea is suggested that these are not two distinct species of bacteria, but that the fusiform rods and the spirochetes are two characteristic forms of one and the same microbe.

H. Beitzke, who in 1904 compiled much of the earlier literature on fusiform rods, states that many of the older investigations on

noma seems to indicate that this interpretation is correct. One encounters, he says, all the intermediate forms between fusiform rods and spirochetes on the border between healthy and sick tissue.

But generally speaking the standpoint of these earlier investigators was based upon speculations on the bacteria forms which they saw in direct preparations. They could not prove their claims nor experiment in that direction, as cultivation was largely unsuccessful.

It aroused considerable interest therefore when Ruth Tunnickliff (1906) on the basis of her cultivation results, again acclaimed that there was a relation between *Fusobacterium* and the spirochetes. Later this author has, more eagerly than anyone else, championed the theory that these two morphologically different species are actually one and the same microbe. And since Tunnickliff's name is always associated with this problem it is necessary to examine her investigations more carefully.

In her pure cultures of fusiform rods Tunnickliff claimed she could demonstrate that spirochete forms appeared, resembling the large spirochetes found in the mouth. These spiral forms were said to develop especially on malt extract blood agar. These forms appeared after a couple of days and as time went on became more numerous than the original rod form. She believed that the spirochetes were a developmental stage in the life cycle of the fusiform rods.

Later, in 1923, Tunnickliff claimed she had seen spirochetes develop within the fusiform rods, and in the spherical bodies which *Fusobacterium* is said to form in one stage.

In 1932 Tunnickliff takes up this subject again, but talks about »spiral forms« without claiming that they have a definite spirochetal character. She claims that the change from typical fusiform rods to spiral forms is the expression of a dissociation, a transition from smooth to rough colonies. Colonies which are smooth contain rod formed bacteria, while rough colonies consist of the spiral form.

A tremendous literature has grown up around these problems, which are of interest far beyond the field of fusospirochetosis. This is closely related to the problem of the bacteria's life cycle. And the old conflict between monomorphism and pleomorphism is more actual for the group of bacteria treated here than for many others.

Among others who share Tunnickliff's view, that the fusiform rods and the spirochetes found in fusospirochetal diseases are only two forms of the same bacterium, we can mention Tohl Shmamine (1912), W. P. Larson and Moses Barron (1913), and W. N. Klimenko (1914). But those whose work is best known and who seem to have

most influence are G. Sanarelli (1927) and David T. Smith (1932).

Sanarelli cultivated some spirochetes from the intestines of guinea-pigs which were very like those found in the oral cavity of humans, in Plaut-Vincent's angina, in bronchospirochetosis etc. He cultivated the spirochete on Tarozzi medium (agar slants with a piece of sterile guinea-pigs kidney in the condensation water). If he added an extract of *B. mesentericus vulgatus* to this medium, the spirochetes turned into typical fusiform rods. He succeeded in getting one strain that was stabile, it retained its morphological characteristics as a typical fusiform rod in subcultures.

He believed that these were merely spirochetes which had lost their capacity for movement and for twisting and spiraling. The serological properties were the same as those of the original spirochete strains. This transformation from spirochetes to fusiform rods could take place directly, but sometimes it went through an intermediate stage where large numbers of spherical bodies appeared in the cultures. Sanarelli was of the opinion that this was the basal form of the bacterium, which gave rise both to fusiform rods and to spirochetes. He called it »*Heliconema Vincenti*«.

David T. Smith cultivated several types of fusiform rods and also *Treponema buccale* in pure cultures. This *treponema* later took on the appearance of a fusiform rod. Smith had exchanged cultures with Tunnicliff and found that this *Treponema buccale* was identical with the large fusiform rods which Tunnicliff had described. Smith had also isolated other strains of fusiform rods which became spirilla forms and returned to fusiform rods again.

But most of those who have worked with *Fusobacterium* and spirochetes seem to be of the opinion that these are two entirely independent bacteria.

As early as 1906 P. Mühlens and M. Hartmann came to this conclusion on the basis of their results with pure cultures. They were able to cultivate both fusiform rods and a mouth spirochete (*Treponema dentium*) in pure culture but they never found any transition between the two forms in pure culture. Charles Krumwiede and Josephine Pratt (1913) who worked with pure cultures of fusiform rods, also claimed that these were two completely distinct bacteria.

In his well known publication on the classification of *Fusobacterium* Philip L. Varney (1927) described a large type of fusiform rods which showed a pronounced tendency to produce twisted forms, especially in young cultures. When the cultures grew older he found mostly typical fusiform rods, straight and with pointed ends. He never observed any motility in his cultures even there were the spirochete forms were in the majority. He doubts that

there is any connection at all between fusiform rods and spirochetes. He also emphasizes the confusion which the claim to such a relationship has brought into the study of fusiform rods.

W. Bachmann and H. Gregor (1936) found that in an otherwise typical *Fusobacterium* (their »Schnell und grosswüchsige Fusiforme«) all kinds of involutions forms appeared in old cultures, and they saw forms in stained preparations which even to an experienced observer looked like spirochetes. However, dark field examination of the same cultures revealed completely immotile and often perfectly straight rods. These had the same plasma structure which *Fusobacterium* usually has. They believed that this tendency to produce spirochete-like forms is connected with the tendency of certain strains to grow into long filaments. By cultivating on malt extract bloodagar as Tunnicliff recommended, they found this tendency to thread formation, but no spirochetes. These authors emphatically deny that there is any identity between fusiform rods and spirochetes.

Maynard K. Hine and George Packer Berry (1937) in their morphological study of the genus *Fusiformis* often found spirochete-like forms in their cultures of *Fusiformis dentium*. But they believe that these only have a superficial resemblance to the mouth spirochetes, and distinguish themselves clearly from these by size and staining.

Earle H. Spaulding and Leo Rettger (1937) also tried cultivating on malt extract blood agar to produce spirochete forms but without success, similarly with extract of *B. mesentericus*. They found that the bacteria had a greater tendency toward spiral forms and involution when the medium was acid, and also if too much heat was applied during fixation. They believed that the spirochete forms were not a morphological variant of *Fusobacterium*. On the whole they found them very seldom.

It thus appears from the literature that there is still disagreement as to the relation between *Fusobacterium* and thorough spirochetes. But it seems that most, and the most thorough of the investigations, indicate that two completely distinct bacteria are involved.

### *Personal investigations.*

Already during our work on *Leptotrichia Trevisan* (Th. Thjøtta, Otto Hartmann and Johs. Bøe, 1939) we had seen how readily thread form bacteria can assume irregular forms.

We, believed like most other investigators, that these were largely »involution forms« when we found swollen, pointed, unevenly stained bacteria which were usually tightly curled. We believed in the case of *Leptotrichia buccalis*, that it was a sign that the culture was fullgrown, and that it was a phenomenon which occasionally occurred in all strains.

Among the twisted forms which we observed, there were sometimes bacteria, which by their appearance, might be taken for a large *Borrelia* species. We interpreted this as an accidental artefact. There was absolutely nothing which distinguished this type of culture from another where such forms did not occur. Dark field examination revealed no more, and subcultures always gave growth of the typical microbe.

We had also seen this twisted form earlier while working with a non-sporulating microbe which was either identical with *B. funduliformis* or closely related. It was extremely pleomorphic and sometimes showed forms which looked like spirochetes.

During the systematic investigation of the Genus *Fusobacterium* by one of us (Johs. Boe, 1941) we immediately encountered this problem of spirochetes. All our strains of *Fusobacterium* had their typical form but, especially when they developed threadforms, they had a tendency to develop very peculiar »involution forms«. Among these we sometimes saw »spirochete forms« just as we had seen them in *Leptotrichia* and we interpreted them in the same manner.

But while it was easy to place the twisted forms of a large *Leptotrichia* where they belonged, it was more difficult when dealing with a thin, fine thread formed fusiform rod which was delicately twisted. They could often really resemble true spirochetes.

As chance would have it, one day we came across a preparation which contained »spirochete forms« in such large quantities that the condition was investigated more carefully. Routine control of the growth of our strain no. 22 revealed almost exclusively these twisted forms. (Fig. 1).

Strain no. 22 had been isolated 6 months earlier from a



Plaut-Vincent's angina and had gone about 50 generations on artificial medium. It was in every respect typical for this group and on usual media it had a uniform morphology. It was, like all the other strains, Gram-negative and immotile.

The preparation shown in Fig. 1 which was the basis for the investigation was taken from a 48 hour old potato broth

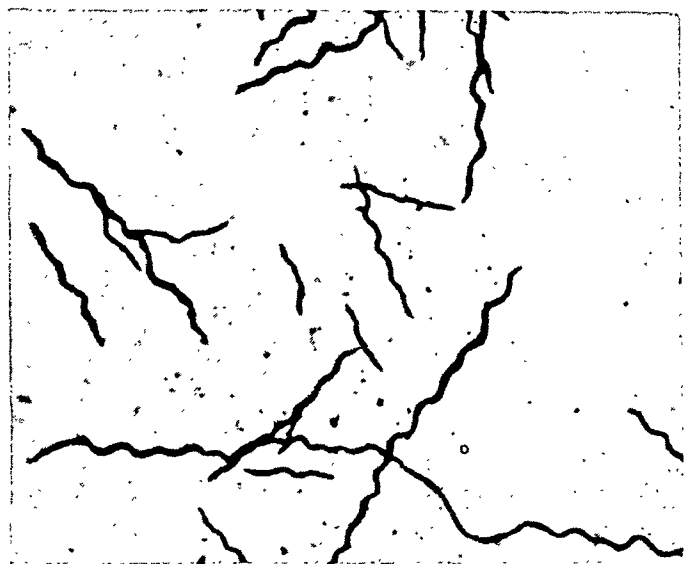


Fig. 1.

× 1300.

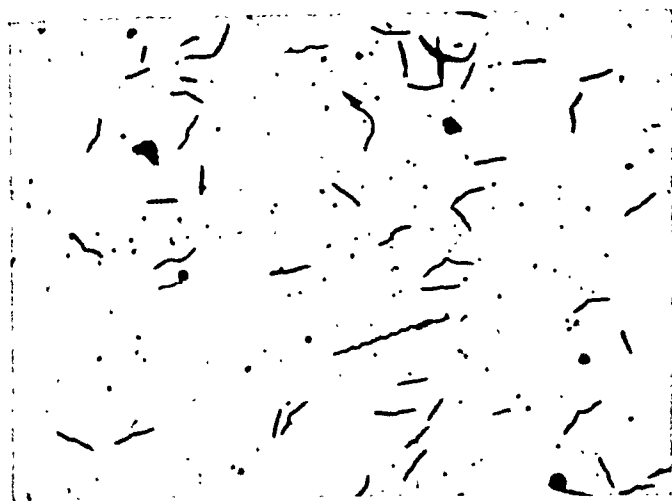
culture. This culture was then examined directly and in dark field. No spirochete like forms were found, the bacteria were of the ordinary rod form. There was no motility. A new stained preparation showed the ordinary picture of a culture of *Fusobacterium*.

It was then found that the first preparation had been stained by allowing a drop of the culture to dry rapidly over a gas flame (to save time) and afterwards phenol gentian violet was poured on the slide while it was still warm.

In this manner the »spirochetes« shown in Fig 1 had arisen.

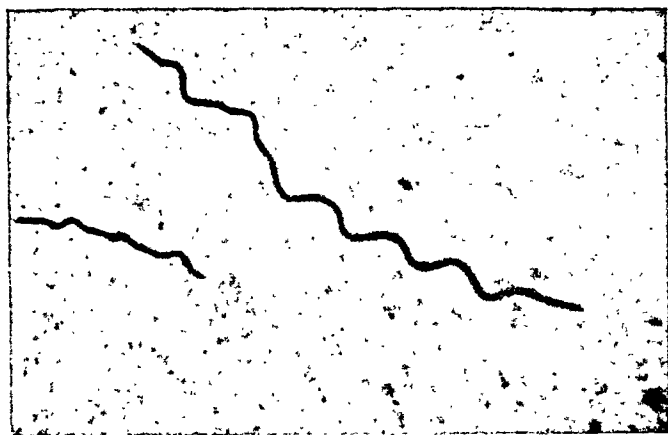
This demonstrated in a very convincing manner that at least many of the spiral forms which had been described so often were artefacts. The forms which we had found were

fully as spirochete like as those described by many investigators who claim there is a transition between *Fusobacterium* and spirochetes (e. g. Tunncliffe).



*Fig. 2.*

× 1000.



*Fig. 3.*

× 1300.

Afterwards we tried to produce these twisted forms in several cultures by this and other methods. We were not always successful, but now and then it was possible, and in the course of the investigation we have seen such »spirochetes« in the majority of our strains (Figs. 2, 3 and 4).

This result is best obtained by heating broth preparations before they are dry and staining on the warm slide. Stain with phenol gentian violet is best and gives these spiral forms with most typical experience, but they may also be obtained with phenol fuchsine.

It is easy to convince oneself that it is not only staining method which is responsible for this. Sometimes it is quite

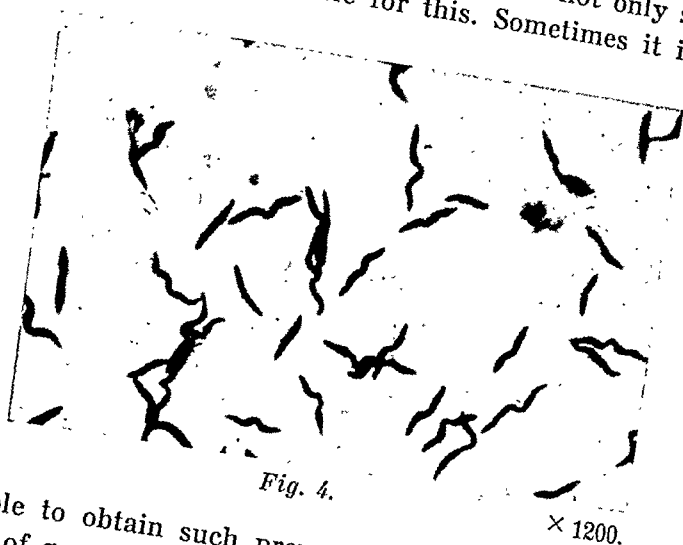


Fig. 4.

× 1200.

impossible to obtain such preparations from a culture, and a couple of generations later they may be obtained in almost every preparation. It seems that the microbe is more vulnerable at certain times than at others (perhaps during particular phases of growth). Some strains produce these twisted forms more readily than others.

In any particular strain it will be easier to obtain the twisted spiral forms in a culture which shows thread formed bacteria, and particularly if it has numerous involution forms. Similarly they are more readily found when the preparation is taken from the irregular forms which have sunk to the bottom of a culture, than when it is taken from the upper layers of the same culture where the typical young forms are more numerous.

As mentioned above, irregular forms are often found in old cultures where the bacteria have grown rapidly on rich

media. The same is also true when the microbe has grown slowly under poor conditions, for example when cultivated on the lowest  $p_{H}$  which it can tolerate or on the highest dye concentration which it tolerates. In these cases it was also possible to obtain the twisted forms.

We inoculated many such cultures on the richest media, on spirochete media such as Noguchi medium and Tarozzi medium. But not once was there growth of anything which could be taken for spirochetes on these media. But we often saw, as on other rich media, the production of long, irregular forms, from which spirochetes could be »manufactured«.

As a result of Tunncliffe's claim that the transition between fusiform rods and spirochetes is related to the »Smooth« and »Rough« form of the colonies, we examined our strains with this object in mind. We never found that the »Rough« colonies contained more spiral forms than the »Smooth« colonies. What we did find, as has been mentioned above, was that the individual bacteria in the »Rough« colonies were longer than in the »Smooth« colonies and often more bent and twisted. And quite reasonably, it was easier to produce spiral forms from these than from the short, straight microbes in the pure »Smooth« colonies.

It should again be emphasized that each time we found spirochete like forms in a preparation, we examined the culture very carefully in unstained preparations and in dark field, and we transferred the culture to several new media and controlled its growth from the very beginning. We were convinced every time that the production of the twisted forms was a physical phenomenon.

### *Discussion.*

It seemed very improbable from the beginning that two so different microorganisms as *Fusobacterium* and spirochetes should only be two forms of the same microbe.

We do not claim that all of the »spirochetes« which have

been described as having their origin in pure cultures of fusiform rods have the same banal origin as the spiral forms illustrated here. But we have good reason to believe that Tunnicliff who has contributed most of this confusion, has produced her »spiral« forms in a similar manner. In her publication of 1932 Tunnicliff states: »Occasionally it was necessary to stain with heated gentian violet to demonstrate these small spirals, especially in old cultures.«

The question of pure cultures or not is also significant here. Tunnicliff has undoubtedly worked with pure cultures, and she has undoubtedly also worked with typical strains of *Fusobacterium*. But her results are in such sharp conflict with those of many others who have worked with pure cultures that she has interpreted her observations incorrectly. The »spirochetes« found in stained preparations of *Fusobacterium* cultures are artefacts produced by some physical phenomenon. In the same preparation there are often zones where the bacteria have their normal form, while in other zones almost all of them are twisted like spirochetes.

In this connection the most significant fact is that the spiral forms do not represent biological forms, but are artefactually produced. But when it is claimed that motile spirochetes are found in pure cultures of *Fusobacterium*, this cannot be set aside with the same explanation. Such motile forms have been described by Tunnicliff, Sanarelli and others.

Sanarelli's experiment looks very convincing, but it should be pointed out that he worked with a *Fusobacterium* of a very peculiar type (isolated from the large intestine of a guinea-pig), and so different from the ordinary type that it has been placed in a separate group (*Heliconema Vincenti*) which has a very vague systematic position. Its tendency to produce spheroid bodies makes it reasonable to place it nearer the funduliformis group, or as Weinberg, Nativelle and Prevot suggest, to place this group between *Spirillaceae* and *Spirochetaceae* as a distinct family, *Heliconemaceae*. Sanarelli really seems to have worked with a species of bacteria which was closely related to the spirochetes.

There is no proof that the various morphological forms found in *Fusobacterium* are different stages in a particular life cycle. The question of a life cycle in *Fusobacterium* is just as vague as for other microbes, but some authors claim that there is such a life cycle (Ralph R. Mellon, 1926).

### Summary.

1. *Fusobacterium* belongs to a group of bacteria which is very pleomorphic, with a decided tendency to develop atypical forms.
2. The assumption that spirochetes could arise in pure cultures of *Fusobacterium* found support in the fact that these atypical forms were mistaken for spirochetes.
3. In most cases spirochetes described are artefacts and are not an expression of any biological form.
4. The authors were able to produce typical spiral forms by a few tricks with the staining method, and by choosing cultures where atypical forms were abundant.
5. *Fusobacterium* and spirochetes are absolutely distinct microorganisms.

### LITERATURE

- Backmann, W. und Gregor, H.*: Zeitschr. Immunitätsf. 1936:87:238.  
*Beitzke, H.*: Zbl. Bakt. I. Ref. 1904:35:1.  
*Boc, Johs.*: *Fusobacterium*. Studies on Its Bacteriology, Serology and Pathogenicity. Oslo 1941.  
*Hine, Maynard, K. and Berry, George Packer*: J. Bact. 1937:34:517.  
*Klimenko, W. N.*: Zbl. Bakt. I. Orig. 1914:74:487.  
*Krumwiede, Charles Jr. and Pratt, Josephine*: J. Inf. Dis. 1913:12:199.  
 — J. Inf. Dis. 1913:13:438.  
*Larson, W. P. and Barron, Moses*: J. Inf. Dis. 1913:13:429.  
*Mellon, Ralph*: J. Bact. 1926:12:279.  
*Mühlens, P. und Hartmann, M.*: Zeitschr. Hyg. 1906:55:81.  
*Plaut, H. C.*: Deutsche med. Wschr. 1894:20:920.  
*Sanarelli, G.*: Ann. Inst. Past. 1927:41:1 and 679.  
*Shmanine, Tohl*: Zbl. Bakt. I. Orig. 1912:65:311.

- Smith, David T.: Oral Spirochetes and Related Organisms in Fusospirochaetal Disease. London 1932.
- Spaulding, Earle H. and Rettger, Leo F.: J. Bact. 1937:34:535 and 549.
- Thjotta, Th., Hartmann, Otto and Bøe, Johs.: A Study of the Leptotrichia Trevisan, Oslo 1939.
- Tunnickliff, Ruth: J. Inf. Dis. 1906:3:148.
- J. Inf. Dis. 1923:33:147.
- J. Inf. Dis. 1933:53:280.
- Varney, Philip L.: J. Bakt. 1927:13:275.
- Vincent, H.: Ann. Inst. Pasteur. 1896:10:488.
- Weinberg, M., Nativelle, R. et Prevot, A.-R.: Les microbes anaerobies. Paris 1937.

ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE  
CAUSING A FATAL MENINGEAL INFECTION  
IN A HUMAN BEING

By Th. Thjötta, M. D.

(Received for publication Dec. 6th 1942).

On the 23 of May 1942 we received a specimen of pus for bacteriological examination. The specimen was sent us by Dr. Arne Torkildsen who had evacuated the same from an abscess situated in the right temporal region between the dura mater and the arachnoidea of a patient with the following history:

The patient was a veterinary physician, 53 years of age, who during the last years had suffered from attacks of what had been considered rheumatism. He had passed through such an attack during the months of February and March the same year. The consulting physician Dr. Leif Cordtsen, however, claims that this attack looked more like an attack of influenza with complications of the lungs. Having recovered from this disease he felt quite well till the 20th of April, when he had several slight attacks of paresis of the left side of the body. He had no nausea, no vomiting and no cramps during these attacks, and he was quite well in the intervals. During the following week the condition got worse, a strong headache came on and the patient lost his appetite. He was then sent to hospital in Oslo for treatment. Here he showed



a slight and irregular fever and his diagnosis was not clear. The clinicians held it most probable that he suffered from a tumour of the brain. His condition grew continually worse and on the 22nd of May he was transferred to a surgical hospital in comatous condition. The operation was performed on the next day, and the patient died the following night.

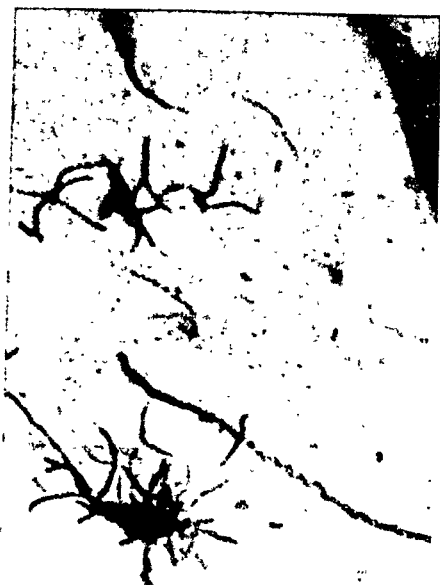
### *Examination of the pus.*

The pus was of a very thick and sticky consistency. There was no odor. No granules of *Actinomyces* were found although a minute examination was carried out for such granules. A preparation of the pus stained after the Gram technique was then examined under the microscope and large clumps of a Gram positive irregular long threadlike microbe intermixed with short straight or slightly curved rods were found in considerable amount. (See Figs. 1, 2, 3 and 4). These microbes were often knitted together in large tangles, where the individual threads obviously stretched out in all directions from a center. The microbe thus might well be taken for an *Actinomyces* and the pus was therefore again examined for granules. But no such were present.

The possibility of an *Actinomyces* was given up for the time being and a tentative diagnosis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* was made both on account of the morphology of the microbe, although this might seem extraordinary, and because the patient was a veterinarian, who most probably had been in contact with swine erysipelas in his practice.

In the meantime cultures were made in different media, both aerobically and anaerobically. The result of these examinations were in short as follows:

Our microbe did not grow at all under aerobic conditions. Anaerobically, however, it grew, although slowly in 1 % dextrose broth with a piece of sterile potato under vaseline cover, in Difco brain-heart extract semisolid medium and on the surface of a common blood agar dish. In all these cultures we obtained a pure growth, that could be grown in



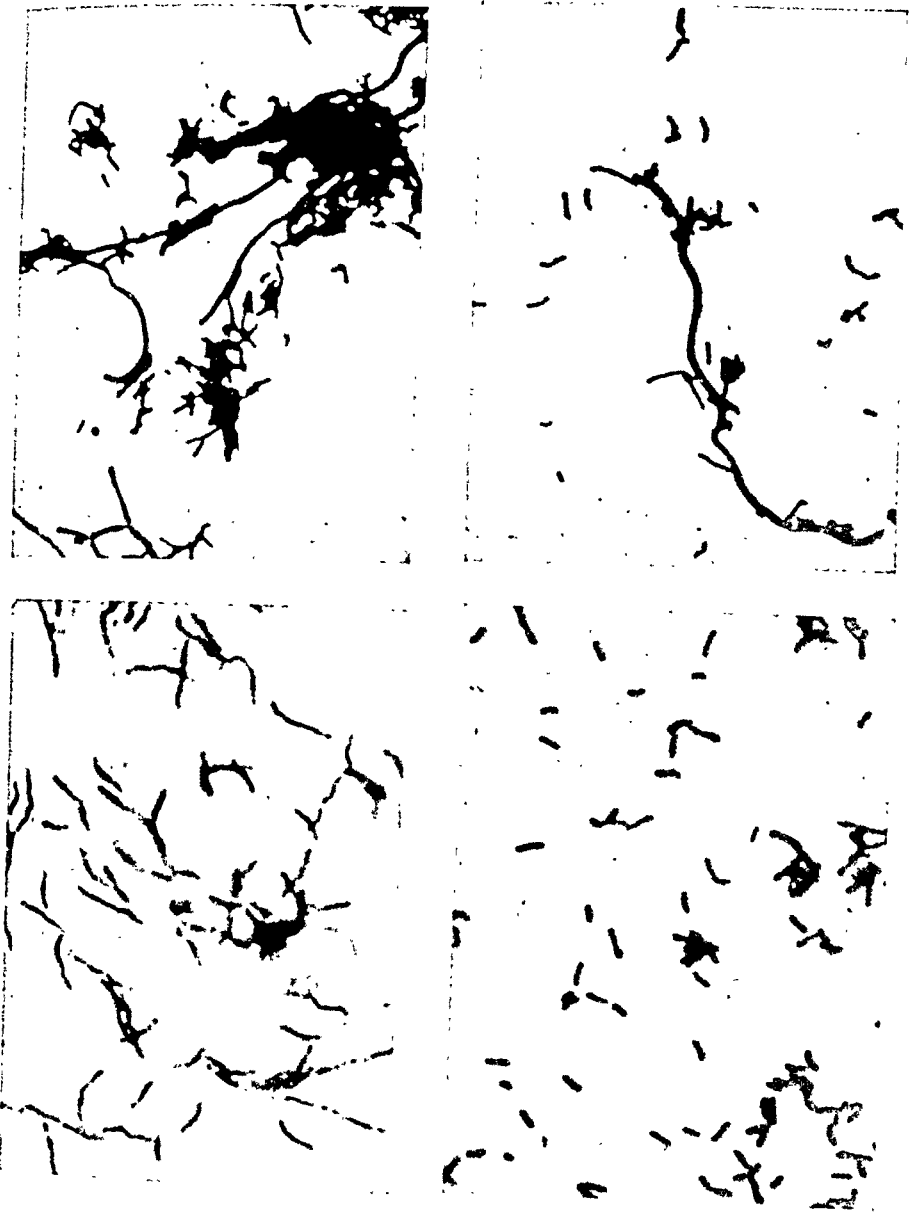
*Figs. 1, 2, 3, 4.*

Photos from different parts of pus from the meningeal absces.  
× 1000.

one subculture after the other. During this cultural work we observed that the individual microbes slowly changed their appearance from the tangled mass of threads found in the material from the patient through some cultures with long threads (Figs. 5 and 6), from these to cultures with shorter threads (Fig. 7) until individuals appeared (Fig. 8) as very short straight or slightly curved rods of the morphological aspect one should expect when dealing with the *bacillus* of swine erysipelas. The appearance of the microbe in culture successively altered from that in the living material of the patient until all likeness to an *Actinomyces* had disappeared. We were at this point of our examination pretty certain that we were dealing with *Erysipelothrix rhusiopathiae*, and we had only to perform a serological examination of our microbe in a serum obtained from *The Veterinary Institute* of this city (Professor *H. Holth*) and produced against typical strains of the same microbe isolated from swine erysipelas. By courtesy of the same institute we also obtained a typical laboratory strain of the etiological agent of the disease in swine and with this material we performed an agglutination with both strains in the same anti-swine erysipelas serum. The serological test gave a positive reaction to the same dilution of the serum in both strains, and the diagnosis was thus consolidated.

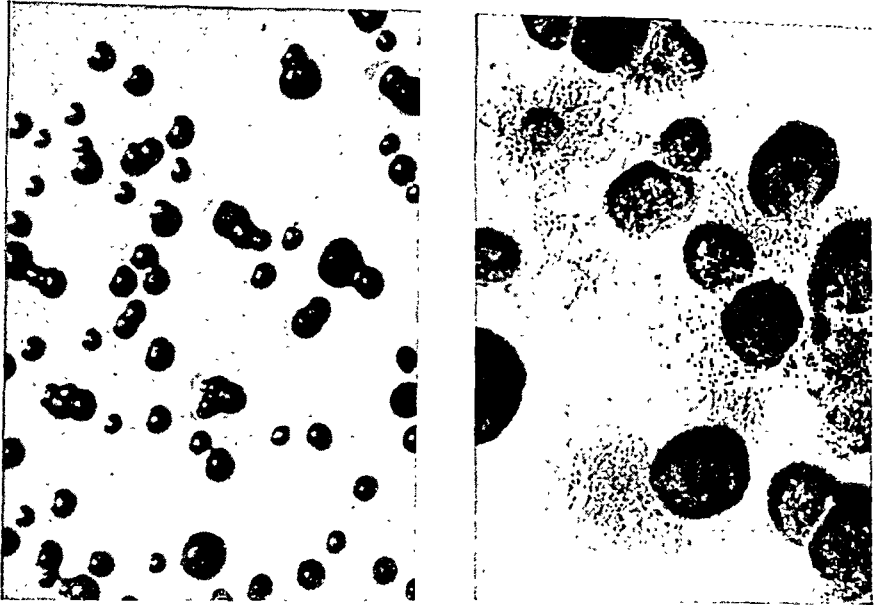
The colonies (see Fig. 9) of our microbe on surface media were mostly of the R type, but a few S colonies were also found. And in between the ordinary colonies we found some very peculiar ones shown in enlargements of about 30 diameters. These colonies showed very fine rhizoid offshoots making an irregular fringe about the colony (Fig. 10).

Having thus ascertained the diagnosis of our microbe we went through the literature at hand. We found only one case that might be of the same kind as ours, namely a case referred by *J. Dumont* and *L. Coton* (1) who found the same microbe in the spinal fluid of a soldier who died shortly after the examination. The condition of the meninges is however not described. The authors found their strain only slightly



*Figs. 5, 6, 7, 8.*

Photos from cultures of the isolated strain 5 and 6 in brain-heart semisolid medium, 7 and 8 from bloodagar surface at different periods of the cultivation of the strain.  $\times 1000$ .



*Figs. 9, 10.*

Colonies of the strain on surface of bloodagar. 9:  $\times 10$ , 10:  $\times 30$ .

virulent for white mice, a point of interest in our case, since our strain did not show any virulence against mice.

The virulence against white mice has always been considered a point of considerable interest in this microbe, since the passage through mice of some material containing the microbe in infection is claimed to be the most certain method of obtaining this microbe in pure culture. This, however, seems to be quite uncertain, when one is dealing with material from a subacute or chronic type of infection. Thus *W. Riebe* (2) found that strains cultivated from cases of endocarditis in swine are very often avirulent for mice. He adds that the virulence of this microbe may vary very considerably and that it is often very difficult to conserve the virulence in cultures.

Endocarditis due to *Erysipelothrix* is seen as a typical disease in swine. Also in the human infection this manifestation has been seen. Thus *C. Prausnitz* (3) has gathered from the literature 100 cases of infection in man and amongst

these is one case of endocarditis, in which the microbe was grown from the blood. Likewise *William O. Russell* and *Marion E. Lamb* (4) described a case of endocarditis in a lobsterfisher, who had injured himself while working with lobsters.

As far as we have found there is no case exactly like ours described in a human being. In swine, however, this microbe can produce lesions in the meninges, and *P. Langrand* (5) describes how the microbe, when growing on the surface of the meninges in animals, takes on the appearance of long, curved threads. And *L. Panisset* and *J. Kolda* (6) have described large nests of long, fine threads especially in the valvular lesions of endocarditis. And *J. F. Rosenbach* himself, who described the microbe (7) was in doubt whether it belonged to the bacteria or to the threadlike microbes and would have preferred the name *Erysipelothrix* from the very first. It was, however, named *Bacillus erysipeloides* or *rhusiopathiae* and the name is still in use. The official name, however, is now *Erysipelothrix*, which is more suitable than *Bacillus*, as the microbe now is group in the family *Actinomycetaceae*.

There is consequently no atypical aspect in our strain when looked at in the light of the literature. Also the peculiar colonies of our strain have been described before. *Hugo v. Preisz* (8) says that the colonies may grow as very small spots without a distinct border. When seen at an enlargement of 30—50 diameters these colonies will be seen as a dense center with a periphery that is dissolved into a confused network of irregular curved threads of different thickness.

When the picture that met our eye when first seen in the slide preparation from the patient seemed so unfamiliar, the reason obviously was that the usual textbooks describe this microbe as a very small and delicate rod. This appearance may well be the ordinary in the acute swine erysipelas and in the spleen of mice infected with the microbe (Fig. 12). But in more chronic infections and obviously in the human being one must reckon with the threadlike microbe, the real

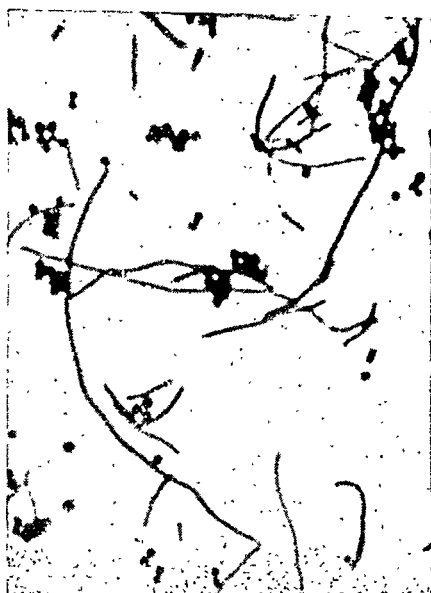
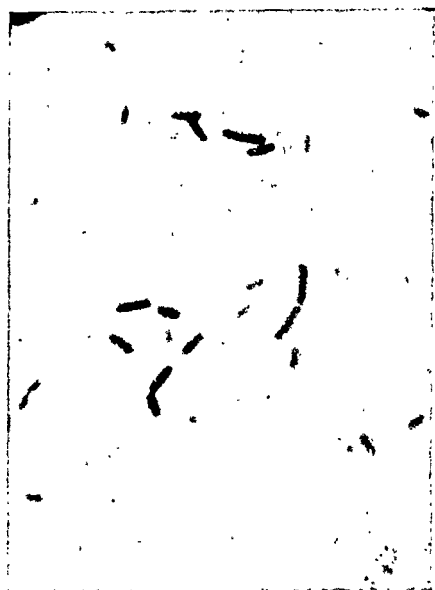


Fig. 11.

Primary culture from typical case of erysipeloid in man. Medium brain-heart semisolid medium.  $\times 1000$ .

*Erysipelothrix*. When cultivated from human beings in a semisolid medium the same picture of the microbe is seen. We had an opportunity to see this very nicely in a culture in brain-heart-extract-agar inoculated directly from a typical case of erysipeloid in a grown woman, infected from the handling of fish. In the cultures the microbe grew together with staphylococci (Fig. 11) and showed long threads of microbes exactly like those of our brain abscess.

If we turn back to our patient and try to discuss his disease in the light of the etiological knowledge we have obtained it seems very probable that the patient must have suffered from an infection due to *Erysipelothrix* for some time. Nobody knows however for how long a time. He is not known to have suffered from erysipeloid or any other distinct clinical phenomenon that points directly towards the infection that caused his death. In swine however, arthritic disease is not so rare in this infection, and it might be a



*Fig. 12.*

Slide preparation from spleen in artificial infection of mice.  $\times 1000$ .

possibility that his so-called rheumatism in reality has been caused by *Erysipelothrix*. Even more suspicious in this connection is the »influenza« that he passed through during February—March 1942. It seems very probable that this disease may have been a complication to a general infection with the microbe in discussion. And it seems most natural to look upon his meningeal abscess as a local manifestation of a general infection.

Could this patient have been saved through a specific treatment? It is well known that the specific therapeutic serum produced against infections caused by *Erysipelothrix* is powerful in its effects, when used in disease both in swine and in human beings. But such treatment naturally depends upon an etiological diagnosis. And this diagnosis could not have been made in any other way than through a thorough bacteriological examination of the patient. This examination, however, came too late to be of any benefit to the patient.



### Conclusions.

1. The author deals with the history of a patient suffering from an abscess of the meninges caused by *Erysipelothrix rhusiopathiae*.
2. The morphological and cultural characteristics of this microbe as found in pus from this abscess are described.
3. It is stressed that one should not always expect to find *Erysipelothrix* as a straight or slightly curved delicate rod, but rather expect to find this microbe as long threads twisted together in large bundles and clumps. This picture will be met with both in pus and in material from endocarditis and in semisolid media.

### LITERATURE

1. Dumont, J. et Coton, L.: Ann. Inst. Pasteur, 1921, 35, 625.
2. Riebe, W.: Arch. f. wissenschaftl. u. prakt. Tierheilk. Bd. 37, cit. fra Kolle, Kraus u. Uhlenhuth Handb. d. path. Mikroorg. 3de opl., Bd. VI, 1, 456.
3. Prausnitz, C.: Centralb. f. Bakt., 1921, 85, 362.
4. Russel, William O. and Lamb, Marion E.: J. A. M. A., 1940, 114, 1045.
5. Langrand, P.: Hyg. d. la Viande et du lait, 1912, 361, cit. fra Kolle, Kraus u. Uhlenhuth etc. 1929, VI, 1, 452.
6. Panisset, L. et Kolda, J.: C. rend. soc. biol., 1924, 343.
7. Rosenbach, J. F.: Arch. f. klin. Chir., 1887, 36, 346.
8. Priesz, Hugo v.: Kolle, Kraus u. Uhlenhuth: Handb. d. Mikroorg. 1929, VI, 1.

## EIN NEUER SALMONELLATYP (S. SUNDSVALL) IN SCHWEDEN NACHGEWIESEN.

Von G. Olin und K. Alin.

(Eingegangen bei der Redaktion 15. Jan. 1943).

Die Anzahl der Salmonellatypen hat in letzter Zeit durch Beobachtungen, die aus vielen verschiedenen Ländern mitgeteilt worden sind, mehr und mehr zugenommen. Aus Schweden ist jedoch bisher kein Beitrag geliefert worden. Neulich haben wir indessen eine Salmonellabakterie nachweisen können, die einen zuvor nicht beschriebenen Typ innerhalb der Salmonellagruppe repräsentiert, und die also den ersten neuen Typ in unserem Lande darstellt. Die fragliche Bakterie wurde aus zwei verschiedenen Fäzesproben isoliert, die von einem Fall von akuter Gastroenteritis in Sundsvall herrührten. Die Krankengeschichte ist folgende.

44-jähriger Bauarbeiter K. E. B., Sundsvall. Erkrankte am 6. 7. 1942 akut mit Schüttelfrost, Kopfschmerzen und stündlich oder alle zwei Stunden auftretenden wässerigen Stuhlentleerungen. Wurde am selben Abend in das Provinzialkrankenhaus eingeliefert. Pat. war da etwas somnolent und hatte Erbrechen. Temp. 40,2°. Die vorläufige Diagnose war: Subarachnoidealblutung? Hitzschlag? Am folgenden Tag lag die Temperatur um 40°, sank aber am 8. 7. auf 38° vorm. und 37,1° nachm. Pat. fühlte sich da bedeutend besser. Da die Diarrhöen immer noch fortfuhren, wurden jedoch am selben

Tage Blut- und Fäzesproben an das Staatliche Bakteriologische Laboratorium zur Untersuchung eingesandt. Bei Aussaat auf Endoagar wurde negatives Resultat erhalten, bei Impfung von *Kauffmanns* (1) kombinierten Anreicherungssubstrat her wurde aber eine Salmonellabakterie nachgewiesen, deren Antigenformel nach der weiter unten näher beschriebenen Untersuchung (I).VI.XIV.XXV. z . . . — e,n,x,z<sub>16</sub> . . . war. Widal war dagegen negativ. Vom 9. 7. an war Pat. symptomfrei. Aus einer Fäzesprobe vom 18. 7. wurde jedoch dieselbe Bakterie isoliert, diesmal bei Direktsaat auf Endoagar. Gleichzeitig ge-

Tab. 1.

Blutprobe entnommen am	O-Antigen	H-Antigen		
	Eigener Stamm I. VI. XIV. XXV.	Eigener Stamm		Poona Spec. z
		1. Phase z	2. Phase e, n, x, z <sub>16</sub>	
8.7.	0	0	0	0
18.7.	1/40	1/640	0	1/320
23.7.	1/320	1/640	0	1/320

Anfangsverdünnung: 1/40.

nommene Blutprobe sowie eine spätere Probe vom 23. 7. bestätigten, dass die nachgewiesene Bakterie die Krankheit des Pat. verursacht hatte (siehe Tab. 1). Später untersuchte Fäzesproben (28. 7., 2. 8. und 7. 8.) ergaben negatives Resultat.

Der Ursprung der Infektion konnte nicht nachgewiesen werden, und ähnliche Krankheitsfälle kamen in der Umgebung des Pat. nicht vor. Ein Jahr vor der Erkrankung war Pat. mit Injektionen eines Impfstoffs geimpft worden, der *S. typhi* sowie *S. paratyphi* A und B enthielt.

Der nachgewiesene Salmonellastamm, für den wir nach dem Ursprungsort die Bezeichnung *S. sundsvall* vorschlagen, zeigte folgende kulturelle Eigenschaften: Bewegliche, gram-negative Stäbchen, die auf gewöhnlichem Agar, Endoagar, Brillantgrünagar und in Bouillon üppig wachsen. Der Stamm spaltet Arabinose, Dextrin (Spuren von Gas), Dextrose, Dul-

cit, Maltose, Mannit, Rhamnose, Sorbit, Trehalose und Xylose binnen 24 Stunden mit Gasbildung. Er spaltet nicht Adonit, Galactose, Inosit, Lactose, Saccharose und Salicin binnen 30 Tagen. Er gibt positives Resultat in d-Tartrat, Natriumcitrat und *Sterns* Glycerinfuchsinbouillon binnen 24 Stunden, aber negatives in Mukat. Der Stamm bildet  $H_2S$ , aber nicht Indol, schmelzt nicht Gelatine und gibt keine Schleimwallbildung.

Genaue Untersuchungen haben für *S. sundsvall* die Antigenstruktur ergeben: (I).VI.XIV.VXV. z . . . — c,n,x,z<sub>16</sub> . . . Das O-Antigen stimmt also vollständig mit dem O-Antigen von *S. onderstepoort* überein; das O-Serum dieser letzteren wird völlig ausgelöscht bei Absorption mit *S. sundsvall*, deren O-Serum seinerseits völlig ausgelöscht wird von *S. onderstepoort*. Bei Aussaat der Primärkultur von *S. sundsvall* wurde festgestellt, dass der I-Faktor bei einigen Kolonien fehlte, bei anderen aber vorhanden war. Auch in dieser Hinsicht liegt also Übereinstimmung mit *S. onderstepoort* vor.

Was das H-Antigen betrifft, so erwies sich *S. sundsvall* als diphasisch bei Untersuchung isolierter Kolonien von der Primärkultur her. Die 1. Phase ist identisch mit der 1. Phase von *S. poona*: z . . . Phasenserum, hergestellt mit diesen beiden Stämmen, werden von dem heterologen Stamm vollständig absorbiert. Gegenüber der 2. Phase von *S. worthington*, ebenfalls bezeichnet mit z . . ., liegt dagegen ein gewisser Unterschied vor, indem deren Serum nicht von *S. sundsvall* und auch nicht von *S. poona* ausgelöscht wird. Die Seren dieser beiden Stämme werden auch von *S. worthington* nicht vollständig absorbiert. Wenn eine erschöpfende Beschreibung der Antigenstruktur durchgeführt werden soll, müsste daher die Antigenformel für die 1. Phase von *S. sundsvall* und *S. poona* mit z, z<sub>30</sub> und für die 2. Phase von *S. worthington* mit z, z<sub>31</sub> angegeben werden.

Für die 2. Phase von *S. sundsvall* ergab sich in der Hauptsache Übereinstimmung mit *S. abortus equi* (c,n,x,z<sub>16</sub> . . .). Die ersten Absorptionsversuche, die mit einem Kaninchenimmuns serum (M. 43) ausgeführt wurden, hergestellt mit dem von der Internationalen Salmonellazentrale in Kopenhagen her be-

zogenen Typstamm Nr. 26 (S. abortus equi  $\beta$  202), zeigten jedoch nicht volle Übereinstimmung zwischen S. abortus equi und der 2. Phase von S. sundsvall. Nach Absorption war nämlich noch eine ziemlich grosse Menge Agglutinine gegen den homologen Stamm vorhanden. Es wurde daher eine eingehende Prüfung der 2. Phase unter Vergleich mit sonstigen bekannten, die Antigenfaktoren e,n enthaltenden Phasen vorgenommen. Hierbei zeigte es sich, dass die Antigenstruktur

Tab. 2.

Stämme	Antigen	$\beta$ -Seren											
		ab. equi Ser. M. 42				ab. equi Ser. M. 43				Sundsvall			
		chest.	diego	dar	sunds.	chest.	diego	dar	sunds.	equi	chest.	diego	dar
Ab. equi $\beta$	e,n,x Z <sub>16</sub>	+	++	++	—	++	++	++	++	—	++	++	++
Chester $\beta$	e,n,x Z <sub>17</sub>	—	++	++	—	—	++	++	++	—	—	++	++
San diego $\beta$	e,n, Z <sub>15</sub> Z <sub>17</sub>	—	—	—	—	—	—	++	++	—	—	—	—
Dar es salaam $\beta$	e,n, Z <sub>16</sub> Z <sub>18</sub>	—	++	—	—	++	++	—	—	—	++	++	—
Sundsvall $\beta$	e,n,x Z <sub>16</sub>	+	++	++	—	++	++	+	—	—	++	++	++

Zeichenerklärung: siehe Tab. 4.

dieser Phasen sehr kompliziert ist, worauf auch *Kauffmann* (2) in seinem grundlegenden Bericht über deren Zusammenstellung hingewiesen hat. Da unsere Untersuchungen Resultate ergeben haben, die einige kleinere Abweichungen von denen *Kauffmanns* aufweisen, erachten wir es für angezeigt, hier unsere Erfahrungen kurz mitzuteilen.

Wie schon erwähnt, wurde bei Absorption von S. abortus equi-Serum, erhalten von Kaninchen M. 43, mit S. sundsvall konstatiert, dass andauernd eine ziemlich grosse Menge Agglutinine gegen den homologen Stamm vorhanden waren. Fast ebenso kräftig wurden jedoch auch S. chester  $\beta$  und S. san diego  $\beta$  agglutiniert. Eine entsprechende Prüfung wurde darauf mit einem anderen S. abortus equi-Serum ausgeführt, erhalten von Kaninchen M. 42, das gleichzeitig mit Kaninchen M. 43 und mit denselben Dosen und demselben Immunisie-

rungsantigen wie dieses immunisiert worden war. Hierbei wurde aber, wie aus Tab. 2 hervorgeht, ein ganz anderes Resultat erhalten. Diesmal ergab nämlich Absorption mit S. sundsvall ein vollständiges Verschwinden sämtlicher Agglutinine. Trotzdem die Immunisierung auf bis ins einzelne

Tab. 3.

Serum M. 43 abs. mit:	Nach der Absorption geprüft gegen die $\beta$ -Phasen:					
	ab. equi	chester	san diego	dar es salaam	sundsvall	Homologer Stamm
S. abony $\beta$	—	—	—	—	—	—
S. bispebjerg $\beta$	—	—	—	—	—	—
S. abortus bovis $\beta$	++	++	++	—	—	—
S. hartford $\beta$	(+)	—	—	—	—	—
S. oslo $\beta$	—	—	—	—	—	—
S. amersfoort $\beta$	—	—	—	—	—	—
S. narashino $\beta$	—	—	—	—	—	—
S. rubislaw $\beta$	++	++	++	—	—	—
S. sundsvall $\beta$	++	++	++	—	—	—
S. hvittingfoss $\beta$	(+)	—	—	—	—	—
S. minnesota $\beta$	++	++	++	—	—	—
S. bonariensis $\beta$	++	—	—	+	++	—
S. chester $\beta$	++	—	—	++	++	—

Zeichenerklärung: siehe Tab. 4.

gleichartige Weise durchgeführt worden war, hat also das eine Kaninchen mit einer kräftigen Agglutininbildung gegen ein Partialantigen geantwortet, das bei dem anderen Kaninchen nicht zur Entstehung einer nachweisbaren Menge Agglutinine geführt hat. Dieses Partialantigen findet sich ausser bei S. abortus equi auch bei S. chester  $\beta$  und S. san diego  $\beta$ , fehlt aber bei S. sundsvall.

Es erschien uns von Interesse, zu untersuchen, ob dieses Partialantigen sich auch bei anderen Salmonellabakterien mit der Antigenformel c,n,x,z<sub>16</sub> . . . nachweisen liesse, eine Untersuchung, die mittels Absorption des Serums M. 43 mit diesen

verschiedenen Stämmen durchgeführt wurde. Wie aus Tab. 3 hervorgeht, ergab es sich hierbei, dass dieses Partialantigen bei den meisten dieser Stämme vorhanden ist, dagegen bei *S. abortus bovis*, *S. rubislaw* und *S. minnesota* fehlt, welche letztere Stämme also in dieser Hinsicht mit *S. sundsvall* übereinstimmen.

Tab. 4.

Kulturen	$\beta$ -Seren															
	S. ab. equi				S. chester				S. san diego				S. dar es sal.			
	abs. mit $\beta$				abs. mit $\beta$				abs. mit $\beta$				abs. mit $\beta$			
	ch.	dü.	dar	su.	eq.	dü.	dar	su.	eq.	ch.	dar	su.	eq.	ch.	dü.	su.
ab. equi	+	+	+	±	—	+	+	—	—	—	±	±	—	+	+	+
chester	—	+	+	±	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—
san diego	—	—	±	±	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
dar es sal.	±	+	+	—	—	—	—	—	(±)	—	—	(±)	—	+	+	+
sundsvall	+	+	+	—	—	+	±	—	—	—	—	—	—	+	+	+

Nach den Absorptionen wurden Agglutinationsversuche mit den Serumverdünnungen 1/40, 1/80, 1/160 usw. angestellt.

++ = Aggl. in Verdünnung = 1/160.

+ = » » » = 1/80.

(+) = » » » = 1/40.

± = » nur für gewisse von mehreren absorbierten Seren.

Bei dieser Prüfung wurde auch *S. bonariensis* untersucht, die von *Edwards* mit der Antigenbezeichnung VI,VIII: i — e,n,x... erhalten worden war. Es stellte sich jedoch heraus, dass die 2. Phase dieses Stammes nicht mit *S. abortus equi* übereinstimmt, sondern mit der 2. Phase von *S. chester* identisch ist. Die Antigenformel e,n,x,z<sub>17</sub>..., die bisher nur durch die letztgenannte Bakterie vertreten gewesen ist, gilt also auch für *S. bonariensis*.

Die vergleichende Untersuchung über die verschiedenen 2. Phasen mit den Faktoren e,n ergab, wie oben angedeutet, Resultate, die in gewissen Teilen von denen *Kauffmanns* abweichen, wie dies aus Tab. 4 hervorgeht. Betreffs der Absorp-

tionen des S. abortus equi-Serums wurde so festgestellt, dass S. chester sämtliche Agglutinine gegen S. dar es salaam aus dem einen, nicht aber aus dem anderen zweier untersuchter Seren eliminierte. Der Faktor  $z_{16}$  scheint also in dem erstgenannten Serum, M. 42, nicht vorhanden gewesen zu sein, das dem oben Angeführten gemäss auch im übrigen sich als unvollständig erwies. Die übrigen Absorptionen des S. abortus equi-Serums wie auch des S. chester-Serums stimmen in der Hauptsache mit *Kauffmanns* Resultaten überein. Nur kleinere Abweichungen wurden bei Absorption gewisser S. san diego-Seren konstatiert. Bemerkenswerter ist, dass S. dar es salaam-Serum nach Absorption mit S. abortus equi keine Agglutination des homologen Stammes gibt, obwohl die Prüfung zwei derartige Seren umfasst hat. In beiden Fällen hat die Immunisierung offenbar nicht zur Entstehung von Agglutininen gegen Faktor  $z_{18}$  geführt.

Es scheint also, als wenn gewisse von den Partialfaktoren der  $\beta$ -Phasen von untergeordneter Bedeutung wären und bei auf gewöhnliche Weise durchgeführter Immunisierung nicht immer entsprechende Agglutinine entstehen liessen. In diesen Versuchen sind Immunseren durch 4 Injektionen mit 4- bis 5-tägigen Intervallen hergestellt worden. Wahrscheinlich hat der untergeordnete Wert der Faktoren einen der Gründe dafür gebildet, dass sie nicht in *Kauffmanns* (3) Antigenchema, das hauptsächlich Anhalt für die routinemässige Typbestimmung geben soll, Aufnahme gefunden haben.

### *Zusammenfassung.*

Ein neuer Salmonellastamm, der erste mit schwedischem Fundort, ist als Ursache eines Falles von akuter Gastroenteritis in Sundsvall nachgewiesen worden. Der Stamm, für den die Benennung *Salmonella sundsvall* vorgeschlagen wird, hat folgende Antigenstruktur: (I).VI.XIV.XXV;  $z \dots$  — e,n,x, $z_{16} \dots$ . Seine kulturellen Eigenschaften werden beschrieben.

Im Anschluss an den Bericht über die Untersuchungen, die der Bestimmung der Antigenstruktur von S. sundsvall zu-



gründe liegen, werden die Resultate einer vergleichenden Studie der  $\beta$ -Phasen in der Salmonellagruppe mitgeteilt. Es wird darauf hingewiesen, dass ihr komplizierter Bau sich nicht immer vollwertig in den entsprechenden Immunseren widerspiegelt. Ein Partialfaktor wurde bei *S. abortus equi* nachgewiesen, der auch bei *S. chester* und *S. san diego* sowie bei den meisten Stämmen mit der Antigenstruktur  $e_{n,x,z_{16}}$  ... vorhanden ist, aber bei *S. sundsvall*, *S. abortus bovis*, *S. rubislaw* und *S. minnesota* fehlt.

#### SCHRIFTTUM

1. Kauffmann, F.: Zbl. Bakt. I Orig. 1930:119:148.
2. — Acta path. microbiol. scand. 1940:17:429.
3. — Die Bakteriologie der Salmonella-Gruppe, Einar Munksgaard, Kopenhagen 1941.

## BEITRAG ZUR FRAGE DER GEOGRAPHISCHEN VARIATIONEN IM ANATOMISCHEN BILDE DER ULCUSGASTRITIS.

Von *Nils Ringertz*, Dr. med.

(Eingegangen bei der Redaktion am 26. Februar 1943).

Im Jahre 1931 hat Verf. eine Untersuchung über die pathologische Anatomie der Ulcusgastritis veröffentlicht, der ein Material von resezierten Ulcuspöden zugrunde lag, welche in Stockholm, hauptsächlich im Maria-Krankenhaus, operiert worden waren. Mit dieser Untersuchung war einmal bezweckt worden, die pathologische Anatomie der Ulcusgastritis zu studieren, sodann nach Möglichkeit zu ermitteln, inwiefern sich das anatomische Bild der Gastritis von dem bei von anderen Orten stammendem Resektionsmaterial unterschied. Den wesentlichsten Vergleichspunkt bildete das von *Konjetzny*, *Puhl* und *Kalima* bearbeitete Kieler Material, bei dem die pathologische Anatomie ausführlich geschildert ist. Ein weiterer Vergleichspunkt stand in der *Bohmanssonschen* Beschreibung eines Ulcusmaterials aus Umeå zur Verfügung. Bei dem letzteren liegt indessen kein eingehender pathologisch-anatomischer Bericht vor.

Diese beiden Vergleichsunterlagen unterscheiden sich klinisch in mehreren Beziehungen von dem Stockholmer Material, während sie miteinander viel gemeinsam haben. So weisen sie durchweg niedrigere Aziditätswerte und kürzere Anam-

nesen auf als das Stockholmer Material. Die hygienisch-diätetischen Verhältnisse sind bei der Bevölkerung, von der sowohl das Kieler Material wie das von Umeå herrührt, auch wesentlich andere als bei der Grossstadtklientel des Stockholmer Materials.

Die pathologisch-anatomische Untersuchung des Stockholmer Materials führte beim Vergleich mit den diesbezüglichen Angaben aus Kiel und Umeå zu folgenden hauptsächlichen Resultaten:

Im *Stockholmer Material* beherrschte eine chronische Gastritis im Bereich der Fundusdrüsenzzone des Magens, oft mit einer Hyperplasie der Lymphfollikel der Schleimhaut (Gastritis follicularis) verbunden, das Bild. Die akut-entzündlichen Veränderungen traten demgegenüber zurück und waren nur in reichlich einem Drittel der Fälle zu konstatieren. Bei diesen Fällen machte sich die akute Entzündung nur als ein verhältnismässig geringer Einschlag in dem vorherrschenden chronischen Entzündungsbilde (im wesentlichen Infiltration polynukleärer Leukozyten in der mittleren Schicht der Schleimhaut, an den Drüsenhälsen sowie Durchwanderung des Oberflächenepithels) bemerkbar. Akute Erosionen waren zwar in der unmittelbaren Nachbarschaft des chronischen Geschwürs häufig, kamen aber in den übrigen Teilen der Schleimhaut bei nur reichlich einem Drittel der Fälle, und zwar meist spärlich, vor. Lediglich in knapp 15 % der Fälle waren die Erosionen so zahlreich, dass möglicherweise von einer »Erosionsgastritis« die Rede sein könnte. Die Erosionen waren so gut wie stets oberflächlich. In der Fundusdrüsenregion waren die entzündlichen Veränderungen viel weniger auffällig und auf die Oberflächenpartie der Schleimhaut begrenzt (fast niemals Drüsenatrophie). Eine akute Entzündung kam hier nur bei einem Fall von Magengeschwür im kardialen Teil der Pylorusdrüsenzzone vor, Erosionen waren ganz selten. Auch die follikuläre Hyperplasie beschränkte sich stets auf die Pylorusdrüsenzzone.

Bei die *Kieler Material* war, laut Beschreibung von Puhl und Kalima, das Bild ein ganz anderes. Die akut-entzündli-

chen Veränderungen standen hier sowohl ihrer Intensität (leukozytäre Durchsetzung der gesamten Schleimhaut) wie ihrer Frequenz nach viel mehr im Vordergrund. Akute Erosionen traten in 70 % der Fälle auf, und in 27,1 % wird das Bild als »ulzeröse Gastritis« mit äusserst zahlreichen Erosionen bezeichnet, von welchen viele tief waren, sogar die Schleimhautbasis erreichten und nach Ansicht von *Puhl* einen Übergang zwischen Erosion und akutem Ulcus darstellten. Nach *Kalina* kamen Erosionen im Bereich der Fundusdrüsenzzone in einem Drittel der Fälle vor.

Bezüglich des *Materials von Umeå* sind die Angaben über das pathologisch-anatomische Gastritisbild sehr knapp. Es wird allerdings angegeben, dass bei 24 von 25 Fällen Eiterkörperchen in der Schleimhaut in solchen Mengen vorhanden waren, dass man die Diagnose ausgesprochen eitrige Gastritis stellen konnte. Nicht selten kamen »miliare Abszesse« vor.

Namentlich im Hinblick auf diese Beschreibung des Ulcusa-gastritisbildes bei dem Material von Umeå erschien es mir interessant, selbst Gelegenheit zur Untersuchung eines Materials von resezierten Mägen aus Norrland zu erhalten, und damit in der Lage zu sein, einen von demselben Untersucher und mit der gleichen Methodik angestellten Vergleich zwischen den Gastritisbildern bei einem Stockholmer und einem norrländischen Material von ungefähr gleichwertigem Umfang zu veröffentlichen. Durch das freundliche Entgegenkommen des Herrn Chefarztes M. Persson, der während vieler Jahre am Garnisonkrankenhaus in Boden tätig gewesen ist, wurde mir ein Material von 56 resezierten Mägen zur Verfügung gestellt, welche unter der Diagnose Ulcus chronicum ventriculi oder duodeni operiert worden waren. Der Grösse nach ist dieses Material einigermassen mit meinem früheren Stockholmer Material vergleichbar, welches aus 87 Fällen bestand (die 10 Fälle von Resektionen bei akut perforierendem Ulcus, welche dem Stockholmer Material als ein Anhang beigefügt worden waren, sind hier abgezogen).

Dieses Material aus Boden ist auch in bezug auf Einheitlichkeit mit dem Stockholmer Material vergleichbar. Wie das

letztere enthält es nicht sämtliche in einem bestimmten Zeitabschnitt (bei dem Bodener Material 1933—1940) resezierte Mägen, aber hinsichtlich der letzten Jahre ist die Serie ziemlich vollständig. Er wurde jedoch keinerlei Auslese vorgenommen, sondern nur zufällige Umstände haben veranlasst, dass einige Resektionspräparate nicht zur Untersuchung gelangten. Das Material stammt vorwiegend von in Norrbotten seit jeher ansässigen Personen, nur ca. 10 % sind mehr oder minder kürzlich zugezogen. Etwa zwei Drittel der Patienten gehören zur Arbeiter- oder Bauernklasse, die übrigen sind Handwerker, Angestellte und Personen in höherer gesellschaftlicher Stellung.

Ich habe nicht die Absicht, hier auf das *klinische Bild* bei diesem Ulcusmaterial aus Boden näher einzugehen, sondern lasse nur einige Angaben über in meiner früheren Beschreibung des Stockholmer Materials berührte Umstände folgen. So findet man zunächst einige kleinere Unterschiede zwischen den beiden in bezug auf die Geschlechts- und Altersverteilung, indem das Überwiegen der Männer und höheren Altersstufen bei dem Bodener Material etwas mehr markiert ist.

	Stockholm	Boden
♂	80,4 %	89,3 %
♀	19,6 »	10,7 »
<20 J.	1,1 »	0 »
20—29 »	21,8 »	15,1 »
30—39 »	37,9 »	30,2 »
>40 »	39,2 »	54,7 »

Die Patienten im letzteren hatten im allgemeinen vor der Operation 2 oder 3 Ulcuskuren durchgemacht, und die mittlere Dauer der Anamnese beträgt 8,6 Jahre. Bei dem Stockholmer Material war die entsprechende Zahl 7,3.

Aus Abb. 1 werden die Aziditätsverhältnisse in den von mir untersuchten beiden Materialgruppen ersichtlich. Den Kurven liegen die Gesamtaziditätswerte bei der letzten Bestimmung von der Operation mit Probefrühstück und üblicher Technik zugrunde. Die Säurewerte liegen beim Bodener

Material etwas tiefer als beim Stockholmer, aber der Unterschied ist nicht so auffällig wie bei dem entsprechenden Vergleich zwischen Material aus dem Maria-Krankenhaus in Stockholm und dem von Umeå (s. Tab. 4, S. 351 bei Ringertz, Acta pathologica 8, 1931).

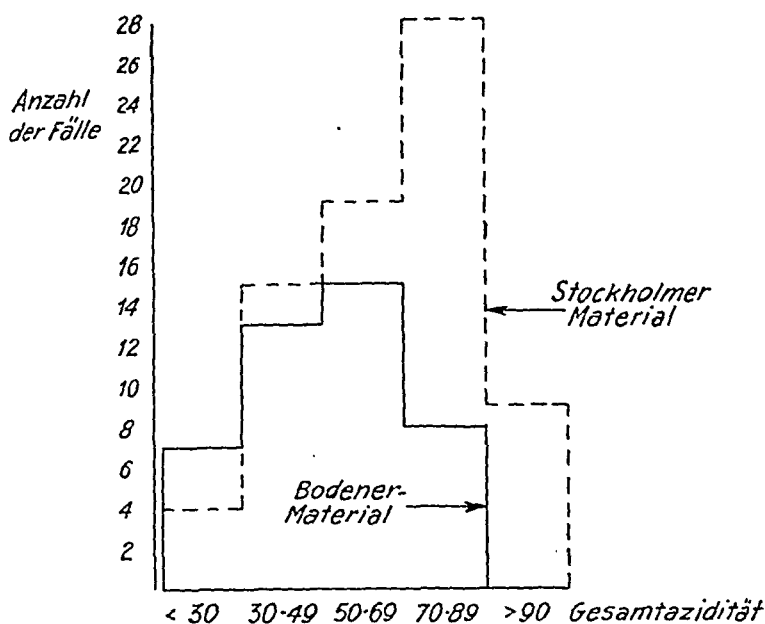


Abb. 1.

Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung des Bodener Materials wurde dieselbe *Technik* angewandt wie bei meiner früheren Untersuchung des Stockholmer Materials. Es wurden also aus den mit Formalin gehärteten und meistens auf Korkplatten aufgezogenen Präparaten längs der kleinen Kurvatur aus der Magenwand Streifen in zusammenhängenden Serien vom duodenalen bis zum kardialen Resektionsrand herausgeschnitten. Ausserdem wurden aus der Seite der grossen Kurvatur sowohl an der Vorder- wie Hinterseite des Magens Streifen entnommen, wobei darauf geachtet wurde, dass auch die am meisten kardialwärts gelegenen Teile der Fundusdrüsenzzone erfasst wurden. Die Schnitte gingen im-

mer durch etwa vorhandene chronische Geschwüre und makroskopisch sichtbare grössere Erosionen. Im Mittel wurden aus jedem Resektionspräparat 10—20 Streifen von 4—5 cm Länge untersucht. Das Material war in Paraffin eingebettet worden und nach Weigert-Hansen sowie mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Im folgenden will ich kurz über die Resultate der in dieser Weise ausgeführten Registrierung des Ulcusgastritisbildes beim Bodener Material berichten und die Befunde im Vergleich zum Stockholmer Material zahlenmässig beleuchten. Ich kann bereits einleitend erklären, dass das Bodener Material ein mit dem Stockholmer im wesentlichen übereinstimmendes Bild aufweist, also nicht ein solches, wie es sich aus der Bohmanssonschen Bearbeitung des geographisch ziemlich gleichwertigen Materials von Umeå ergibt.

Die Verteilung auf *Ulcus duodeni* und *ventriculi* ist im Stockholmer und Bodener Material sehr gleichartig, was aus der folgenden Tabelle ersichtlich wird:

	Stockholm	Boden
<i>Ulcus duodeni</i>	72,3 %	67,8 %
<i>Ulcus ventriculi</i>	24,1 »	26,8 »
kein Geschwür*)	3,6 »	5,4 »

Die *chronische Entzündung* findet man beim Bodener Material in 100 % im Bereich des Zwölffingerdarms und der Pylorusdrüsenzzone. In der Fundusdrüsenzzone sind die chronischen Veränderungen geringfügig (lympho-plasmozelluläre Infiltration in der Oberflächenschicht), und im Hinblick auf die unbestimmte Grenze zwischen physiologischem und entzündlichem Bild kann man keine sichere diesbezügliche Frequenzzahl erhalten. Ich habe jedoch den Eindruck, dass eine chronische Entzündung in der Fundusdrüsenzzone im Material von Boden häufiger ist als in dem von Stockholm; im letzteren begegnet man der chronischen Fundusgastritis so gut

---

\*) die Diagnose *Ulcus* hatte die Operationsindikation gebildet, aber weder bei der Operation noch bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung konnte ein Geschwür festgestellt werden.

wie ausschliesslich bei Fällen von Magengeschwür, im ersteren auch bei dem grösseren Teil der Fälle von Zwölffingerdarmgeschwür. Die hochgradige chronische Gastritis in der Pylorusdrüsenzzone geht oft mit einer erheblichen Umgestaltung der Architektur der Schleimhaut Hand in Hand. Man sieht auf der einen Seite Bilder von Hypertrophie in der Follicularschicht, auf der anderen eine Reihe von Bildern einer mehr oder weniger ausgeprägten Atrophie der Drüsenschicht mit Bindegewebsneubildung. Ich habe nicht den Eindruck, dass irgendein Unterschied im Grade oder der Frequenz der atrophischen Gastritis bei den beiden Materialgruppen besteht; dieser Sachverhalt lässt sich jedoch schwer zahlenmässig beleuchten. Das Phänomen der Darmepithelmetaplasie, welches nach Ansicht gewisser Autoren mit der chronischen Gastritis zusammenhängt, trat in beiden Gruppen mit derselben Frequenz auf:

	Stockholm	Boden
Darmepithelmetaplasie	48,5 %	48,2 %
auch in der Fundusdrüsenzzone	6,2 »	10,7 »

Bei meiner früheren Untersuchung des Stockholmer Materials hatte ich dort sehr häufig eine Hyperplasie der Lymphfollikel der Schleimhaut im Bereich der Pylorusdrüsenzzone gefunden, eine Veränderung, welche stets an der Übergangsstelle zur Fundusdrüsenzzone plötzlich aufhörte. Diese sog. Gastritis follicularis bildete der Beschreibung nach beim Kieler Material keinen stark hervorstechenden Zug; hinsichtlich des Materials von Umeå liegen keine diesbezüglichen Angaben vor. Im Bodener Material kommt diese Veränderung in erheblicher Frequenz vor. Bei meiner Registrierung des Stockholmer Materials hatte ich solche Fälle als Gastritis follicularis (G. f.) bezeichnet, bei welchen in ausgedehnten Schleimhautgebieten pro Zentimeter Schleimhaut mehr als 8 Follikel mit deutlichem Keimzentrum (längs der Muscularis mucosae gezählt) gefunden wurden. Als Follikelvermehrung (Foll.) bezeichnete ich eine weniger markante Zunahme der Follikelanzahl; 1—2 Follikel pro Zentimeter wurde nicht als Ver-



mehrung betrachtet. Eine Registrierung des Bodener Materials nach demselben Prinzip und Zusammenstellung mit dem Stockholmer Material ergibt folgendes:

	<i>G. f.</i>		<i>G. f. + Foll.</i>	
	Stockholm	Boden	Stockholm	Boden
Gesamtmaterial	41,4 %	41,0 %	58,6 %	78,5 %
Ulcus duodeni	44,4 »	44,7 »	61,9 »	86,8 »
Ulcus ventriculi	33,3 »	40,0 »	52,3 »	60,0 »

Wie man sieht besteht also bezüglich der ausgesprochenen Gastritis follicularis eine genau Übereinstimmung der Frequenzzahlen, während das Bodener Material das Übergewicht hat, wenn man auch leichtere Formen von follikulärer Reaktion mitrechnet. Die etwas überwiegende Häufigkeit der follikulären Reaktion bei den Fällen von Ulcus duodeni gegenüber denjenigen von Ulcus ventriculi macht sich in beiden Materialgruppen bemerkbar.

Bei meinem Studium der Sachlage im Stockholmer Material fand ich gewisse Belege dafür, dass die Frequenz der follikulären Reaktion mit steigendem Alter, bei langdauerndem Ulcusleiden (lange Anamnese) und bei hohen Säurewerten zunahm. Das Bodener Material bestätigte diesen Sachverhalt im grossen ganzen. So führt die Aufstellung nach dem Alter zu folgendem Ergebnis:

	<i>G. f. + Foll.</i>	
	Stockholm	Boden
20—29 J.	47,4 %	62,5 %
30—39 »	50,0 »	81,2 »
>40 »	55,9 »	79,3 »

Die mittlere Dauer der Anamnese ist für

	Stockholm	Boden
Gesamtmaterial	7,3 J.	8,6 J.
Fälle mit <i>G. f.</i>	10,0 »	9,3 »

Hinsichtlich der Verschiebung in Richtung auf höhere Säurewerte beim Vergleich einer Kurve für das Gesamtma-

terial mit einer solchen für die Fälle mit follikulärer Reaktion (vgl. Tab. 5, S. 352 in Acta path. 8, 1931) ist allerdings die Sachlage beim Bodener Material wenig markant.

Der Einschlag von *akuter Entzündung*, welcher die Ulcusa gastritis kennzeichnet, hat im Material von Boden im grossen ganzen dieselbe Intensität wie in dem von Stockholm. Die akute Reizung äussert sich in gewissen Fällen als ein entzündliches Ödem mit Erguss von eiweisshaltiger Flüssigkeit in das interstielle Gewebe; in Einzelfällen wird fibrinöse Exsudation beobachtet. Das hervorstechendste Zeichen ist eine Anhäufung von polynukleären Leukozyten, welche sich zu der interstitiellen lympho-plasmozytären Infiltration hinzugesellen. Die Leukozytenanhäufung ist indessen stets eine mässige, und eine Entwicklung miliärer Abszesse wurde nie bemerkt. Meistens erfolgt die Ansammlung in der mittleren Schicht der Schleimhaut, in der Höhe der Mündungen der Drüsen in die Foveolae. Abb. 2 vermittelt einen Eindruck von dem stärksten Grad einer derartigen Leukozyteninfiltration, welcher im Bodener Material zur Beobachtung gelangte. Ausser an den Drüsenhälsen sieht man in einer Reihe von Fällen auch an den Gipfeln der Interfoveolarleisten Leukozyteninfiltrate. Sowohl hier wie an den Drüsenhälsen kann man da eine mehr oder minder lebhaft Leukozytenwanderung durch das Epithel beobachten. An gewissen Stellen kann man konstatieren, dass das Epithel hierbei eine degenerative Veränderung erlitten hat, welche sich in schlechter Färbbarkeit der Kerne und Schwellung der Zellen mit Undeutlichkeit der Umrisse derselben äussert. Es ist wohl wahrscheinlich, dass sowohl die Zelldegeneration als auch der Zustrom von Leukozyten den Ausdruck einer peptischen Schädigung darstellt, und dass wir hier das früheste Stadium der Erosion vor uns haben.

Die im Bodener Material gefunden *Erosionen* sind meistens äusserst feine Epitheldefekte an den Gipfeln der Interfoveolarleisten, mit leichter leukozytärer Infiltration und von einem dünnen »Rauchschleier« aus fibrino-leukozytärem Infiltrat an der Schleimhautseite bedeckt (Abb. 3). Ausserdem kommen

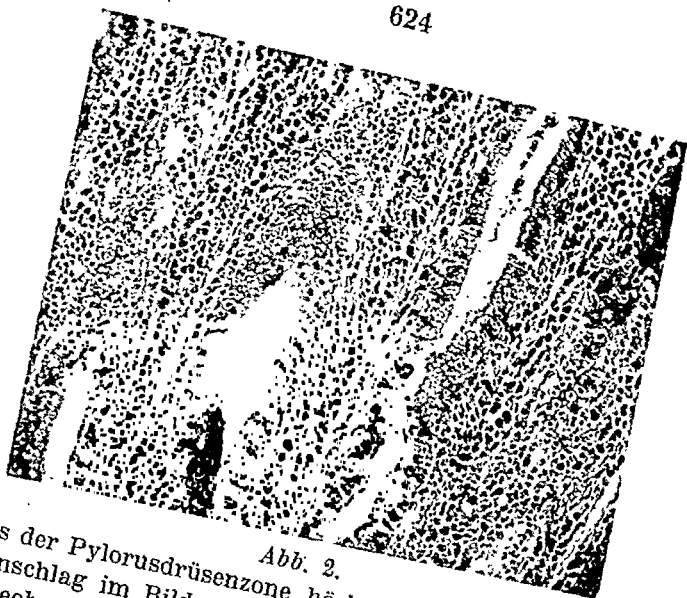


Abb. 2.

Partie aus der Pylorusdrüsenzzone, höchster Grad von akut-entzündlichem Einschlag im Bilde der Ulcusgastritis, welcher im Bodener Material beobachtet wurde (nur 3 Fälle von 56 wiesen stellenweise ein derartiges Bild auf). Man sieht rings um die Drüsenhäuse eine erhebliche Beimischung von polynukleären Leukozyten zu der lympho-plasmozytären Infiltration.  
Fall 52, Präp. D, Vergr. etwa 200fach.

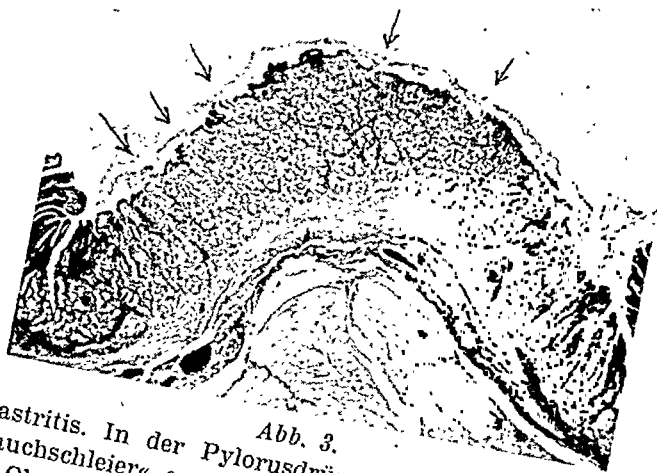


Abb. 3.

Erosionsgastritis. In der Pylorusdrüsenzzone zahlreiche feine, von einem »Rauchschleier« aus fibrino-leukozytärem Exsudat bedeckte Oberflächenerosionen (mit Pfeilen markiert).  
Bodener Material, Fall 54, Präp. B, Vergr. etwa 25fach.

oberflächliche, aber ausgedehntere Erosionen vor, welche eine Anzahl von benachbarten Interfoveolarleistenspitzen oder Zotten im Zwölffingerdarm zerstört haben. Derartige Erosionen werden oft von Blutungen begleitet (hämorrhagische Erosionen). Dieser Typ ist an der Schleimhaut in der Nähe eines chronischen Geschwürs besonders häufig. Nur ganz selten wurden im Bodener Material tiefe, die Drüsenschicht der Schleimhaut oder die Muscularis mucosae erreichende Erosionen beobachtet. Die feinen Erosionen kommen sowohl in den Furchen zwischen den Areolae als auch an der Wölbung der letzteren vor, vielleicht etwas häufiger in den Furchen. Eine augenfällige Lokalisationstendenz der Erosionen über Lymphfollikeln, wie sie z. B. von *Kalima* angegeben wird, war nicht festzustellen. Ebenso wenig bilden Inseln von Darmepithel in der Magenschleimhaut besonders oft den Sitz von Erosionen.

Frequenz und Verbreitung der akuten Entzündung und der Erosionen beim Material von Boden im Vergleich zu dem von Stockholm werden aus der folgenden Zusammenstellung ersichtlich:

	Stockholm	Boden
akute Entzündung	39,0 %	64,3 %
Gesamtfrequenz der Erosionen	49,6 »	83,9 »
davon { nur dicht an Ulcus	15,1 »	55,3 »
{ nicht nur dicht an Ulcus	34,5 »	28,6 »
{ »Erosionsgastritis«	14,9 »	10,7 »

Aus der Tabelle geht hervor, dass die Gesamtfrequenz akut-entzündlicher Einschlüsse beim Gastritisbild in dem Bodener Material höher ist. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die registrierte akute Reizung meistens ganz geringfügig ist; nur in 10 Fällen (17,8 %) war sie erheblicher und lediglich in 3 Fällen von dem Grade, wie es von Abb. 2 veranschaulicht wird.

Bei der Verbreitung der akut-entzündlichen Reizung und der Erosionen spielt die Lage des chronischen Geschwürs im Zwölffingerdarm oder Magen eine Rolle, was ich bereits am Stockholmer Material nachgewiesen hatte. Dasselbe Verhalten macht sich beim Bodener Material geltend:

		Stockholm Boden	
ausgedehnte akute Entz. b. Fällen v.	{Ulc. ventr.	52,4 %	73,3 %
	{Ulc. duod.	34,9 »	60,5 »
»Erosionsgastritis« b. Fällen v.	{Ulc. ventr.	33,3 »	13,3 »
	{Ulc. duod.	9,5 »	7,9 »

Es zeigt sich also, dass die Frequenz sowohl der akuten Entzündungen überhaupt als auch der akzentuierten Form derselben, welche Erosionsgastritis genannt werden kann, bei im Magen befindlichem Geschwür höher ist, als wenn dasselbe im Zwölffingerdarm sitzt.

### *Zusammenfassung.*

Über die vorliegende vergleichende Analyse des pathologisch-anatomischen Bildes der Ulcusgastritis in Material von Resektionspräparaten aus Stockholm und Boden, von demselben Untersucher mit der gleichen Technik und an in bezug auf Grösse vergleichbaren Materialgruppen durchgeführt, lässt sich zusammenfassend folgendes anführen:

1. Beide Materialgruppen sind einheitlich. Das Bodener Material besteht zu etwa 90 % einer in Norrbotten ansässigen Klientel, von der rund zwei Drittel zur Arbeiter- oder Bauernklasse gehören. Das Stockholmer Material setzt sich so gut wie gänzlich aus im Stadtkreis Stockholm wohnenden Personen zusammen, zum grössten Teil aus der Arbeiterbevölkerung und dem unteren Mittelstande.

2. Hinsichtlich der Geschlechts- und Altersverteilung zeigt das Bodener Material ein etwas stärker markiertes Überwiegen der Männer und höheren Altersstufen.

3. Im Material von Boden ist die mittlere Dauer der Anamnese etwas länger, die Aziditätswerte sind niedriger.

4. Die Verteilung auf Ulcus duodeni und ventriculi stimmt in den beiden Materialgruppen überein.

5. Die chronisch-entzündliche Komponente im Gastritisbilde lässt in beiden Gruppen in bezug auf Intensität und Ausdehnung im grossen ganzen keine Unterschiede erkennen.

Die Abweichungen, welche sich geltend machen, bestehen darin, dass das Bodener Material eine etwas grössere Tendenz zu chronisch-entzündlichen Veränderungen in der Fundus-folliculosa aufweist und dass die Gesamtfrequenz der sog. folliculären Reaktionen in diesem Material höher ist. Zieht man jedoch nur die Häufigkeit der ausgesprochenen Gastritis follicularis in Betracht, so verhalten sich die beiden Materialgruppen gleich.

6. Der akut-entzündliche Einschlag im Gastritisbilde ist, was die Frequenz betrifft, im Material von Boden ausgesprochen, aber nicht hinsichtlich der Intensität, welche dieselbe ist.

7. Der Typus der peptischen Erosionen ist in beiden Materialgruppen der gleiche, d. h. es handelt sich vorwiegend um kleine Leistenpitzenerosionen, und ausgedehntere sowie hämorrhagische Erosionen kommen meistens nur ganz dicht an dem chronischen Geschwür vor. Tiefe Substanzverluste sind äusserst selten. In bezug auf Frequenz und Intensität des Erosionsphänomens stimmen die beiden Gruppen in allen wesentlichen Beziehungen überein. So ist die Frequenz der wirklichen sog. Erosionsgastritis in beiden niedrig.

8. Als Gesamturteil ist hervorzuheben, wie gering die Unterschiede im pathologisch-anatomischen Bilde der Ulcusgastritis sind, welche sich in diesen beiden Materialgruppen bemerkbar machen. Dies ist mit Rücksicht auf den Unterschied in den hygienischen und diätetischen Verhältnissen, der, wie man annehmen kann, zwischen der Bevölkerung von Norrbotten und den Grossstädtern in Stockholm besteht, in gewissem Masse überraschend. Es ist auch bemerkenswert, dass das Bild beim Bodener Material so wenig Übereinstimmung mit dem von *Bohmansson* beschriebenen Ulcusgastritisbilde beim Material aus Umeå aufweist.

#### SCHRIFTTUM.

- Å. Aronson in Acta chir. Scand. Bd. 69, Suppl. 7, 1926.  
 Lohner Arch. f. klin. Chir. Bd. 128, 1924.

- Acta chir. Scand. Bd. 58, 1925.
- Konjetzny*: Zieglers Beitr. Bd. 71, 1923.
- Zbl. f. Chir. Bd. 52, 1923.
- Arch. f. klin. Chir. Bd. 129 u. 133, 1924.
- Konjetzny & Puhl*: Virch. Arch. Bd. 262, 1926.
- Puhl*: Virch. Arch. Bd. 260, 1926.
- ibid. Bd. 265, 1927.
- Ringertz*: Acta Patholog. Bd. 8, S. 323, 1931.

## ABSTRACTS — ANALYSES — REFERATE

*Pierre Cazal: Un nouvel aspect de la médecine tissulaire: Les Réticulopathies et le système réticulo-histiocytaire. Paris, Vigot frères, Editeurs, 1942. 597 pages, XX plates.*

This comprehensive monograph deals very thoroughly with the reticulo-endothelial system which is now extended into the reticulo-histiocytic system, taking its particular part in the organism. Like the blood and the connective tissue, it is ubiquitous, being present in all organs. It is to be looked upon as an embryonal tissue, still multipotent, constituting an integrating part of the organism. The interest in its physiological aspects is now overshadowed to some extent by the affections it is subject to: the reticulopathies.

The first part of the book gives a historical, anatomical and physiological survey of the active mesenchyma and its relation to the connective tissue, blood vessels and blood, together with its varying local distribution, structure and function, depending on the milieu (in various organs, nervous system, bone-marrow- etc.). Thorough mention is made of the microglia cells, which are now interpreted as reticulo-histiocytic elements — a view that finds support in the mesodermal origin of these cells and in various histio-physiological variations. Their significance in connection with the cerebral circulation is connected with the question about the secretion of the cerebrospinal fluid and the barrier between the blood and this fluid.

Most often the writer cites the theories advanced by various authors without taking any definite stand himself.

The second part deals with the general symptomatology of the reticulo-endothelial system, giving a survey of the cellular reactions (plasma cells, eosinophil cells) and lesions in various organ systems, bones, skin, lymph nodes, nervous system, etc. The more important affections of this system are, in particular, lymphogranulomatosis, Boeck's disease, lipoidosis, mycosis fungoides, and the histiomonocytic reticulosis.



In discussing the affections of the hypophysis, the writer mentions that they may be latent or give diabetes insipidus, *e. g.*, in Boeck's disease and in Schüller-Christian's syndrome. But the writer is hardly right in claiming that diabetes insipidus in Schüller-Christian's syndrome is not due to hypophysial changes but to compression of xanthomatous osseous tissue. Like the infundibulum and the hypothalamus, the posterior lobe of the pituitary is the site of choice for the lipoid granulomatosis — as a matter of fact, the reviewer has seen this localization in a case of cerebrosid-lipoidosis (Gaucher's disease).

It is also of particular interest to read the section on cerebral localizations of diseases as lipoidosis, lymphogranulomatosis, Boeck's disease and mycosis fungoides, but our conception of the reticuloses is hardly yet sufficiently settled to justify such a sharp classification as presented in the schema on p. 197.

The third part of the book, which is the more weighty part (nearly 300 pages) and of greater practical value to the pathologist, deals with the anatomical and clinical aspects of the reticulopathies. Here a thorough account is given of many diseases which more or less properly may be associated with the reticulo-endothelial system in the broadest sense of the term; and rare but often significant observations from cases described in the literature are pointed out. Besides the diseases mentioned already, this part of the book also deals, among others, with angioreticuloses (Favre, Kaposi, Schamberg), the histiomonocytic reticuloses, Chauffard-Still's disease, Banti's disease and Hanot's disease, amyloidosis and benign and malignant reticulomata.

Schüller-Christian's syndrome is encountered under the lipoidoses as a clear-cut xanthomatosis, and also in the section histiomonocytic reticulosis, where cases are cited with secondary transition to lipoidosis corresponding to the primarily lipid-free granulomata in the initial stage of cholesterol granulomatosis.

On the whole, this book with its comprehensive bibliography (giving 988 titles in full) is a most valuable manual on the highly topical domains of pathology.

Gunnar Teilum.

*Julius Engelbreth-Holm: Leukemia in Animals.*

206 pages. Oliver & Boyd. Edinburgh-London 1942.

This book was written at the request of the Lady Tate Memorial Trust, and undoubtedly will fulfil its mission as a survey of the results obtained by research in leukemia till the years round the outbreak of the war in 1939.

It contains the following main sections: 1) introduction, 2) spontaneous leukoses, 3) hereditary leukoses, 4) experimental leukoses, and 5) nature of animal leukoses.

In an excellent English, which reproduces accurately the shades in the Danish tongue, the writer gives an extraordinarily lucid information about these subjects and their numerous subdivisions, often based on personal experiences. The works of other authors are always mentioned in a most loyal manner, sometimes with a discreet reservation about their acceptance expressed gently in the pointing out of established facts. Not infrequently the author illustrates his statements with experiments carried out by himself — which makes his book more valuable as he carefully distinguishes between his arguments of discussion and his experimental findings which he by no means favors. This is evident from the mention of Engelbreth-Holm & Frederiksen's experiments on cell-free transmission of leukosis in oxygen-free atmosphere, p. 116.

The strictly logical way of presenting the subject, especially in the first section of the book, makes merely the greater problems conspicuous. In return, the more reviewing parts of the book, comparing and correlating the results obtained by various investigators, will prove a source of inspiration to the student of this subject.

The conception of the leukoses as malignant tumors has an ardent advocate in the author. Still, it appears to the reviewer as if the similarities between the two groups of diseases perhaps are emphasized somewhat more strongly than the differences. Thus, it is to be mentioned that by cultivation of leukotic cells in vitro Bichel did not — as might have been surmised from the book — find the leukotic cells to grow infiltratively »like tumor cells«. For that matter, it seems a little categorical when it is stated that Bichel was unable to obtain a pure culture of leukotic cells. These cells could be cultivated only on the stroma of fibroblasts, it is true, but as these fibroblasts were derived from chicken and the leukotic cells from mouse, the result appears practically to be a pure culture obtained through heterologous symbiosis.

Concerning heterotransplantation it says on p. 53: ».... the heterologous transplantation of neither leukemic nor other kinds of neoplastic tissue can be expected to be successful«. But on p. 144 it says: ».... the heterologous transplantation of mouse leukemia into rats may be attained in this way«. (Also this difference between leukosis and tumors — which presumably is due only to the requirement of a stroma for the latter — might perhaps have been emphasized more.)

But when mention is made of small inaccuracies as these it.

is only fair to point out that owing to the present conditions the author was unable personally to attend to the publication of his book.

The last chapters, dealing with the interaction between hereditary and exogenous factors, studies on the metabolism, etc., give a review of the most recent investigations reported in other countries. To many readers they will prove new information, and they will be of interest to all.

The list of references and index are of a high quality and make the book particularly serviceable as a manual. There can hardly be any doubt, then, that within a few years it will be found in every well-equipped institute for research in malignant neoplasms all over the world. It will do credit to its author.

*Johannes Clemmesen.*

## EFFECT OF GONADOTROPIC HORMONES IN THE MALE ORGANISM.

By Tage Kemp, Kaj Pedersen-Bjergaard & G. Bollerup Madsen.

(Received for publication January 31st, 1943).

When, in 1926, the pituitary gonadotropic hormones were discovered, it was realized at once that they were of superior, sexually unspecific, nature. At first, however, investigation into their effect was chiefly limited to the female organism. Soon after, it was found that substances with a similar effect could be formed also in tissues or organs other than the pituitary body, especially in chorionic epithelium.

In the pituitary two gonadotropic hormones are produced:

1. The follicle-maturing or follicle-stimulating hormone (FSH) which also is called the gametokinetic hormone, because of its stimulating effect on the gametes: the ovarian follicle (ovum and granulosa) in the female organism and the germinal epithelium in the male. It promotes the production of estrogen in the ovary, possibly in the testis too, and perhaps also a special, still obscure, hormone in the seminiferous tubules.

2. The luteinizing hormone (LH), acting chiefly on the connective tissue elements of the gonads: cells of the theca folliculi in the ovary, and the interstitial cells of the testicle, the growth of which cells is stimulated. Further, this hormone also induces luteinization of the granulosa epithelium of mature and ruptured ovarian follicles. It promotes the production of corpus luteum hormone and androgen (testosterone), respectively.

FSH is hardly able by itself to induce ovulation, which process

also requires the cooperation of LH. The ovulation takes place when LH commences to exert its effect — at a juncture when the follicle, under the influence of FSH, has attained its proper development. There has to be a certain balance between the two hormones, quantitatively as well as chronologically. In the ordinary experimental animals the gonadotropins have no sure effect on the gonads before a certain length of time after birth.

The chorionic epithelium produces a hormone — chorionic gonadotropin (ChG), which in its effect quite corresponds to the luteinizing hormone.

In the first years after the discovery of the gonadotropic hormones, attempts at their clinical employment did not turn out successful because they were given in inadequate doses. Gradually, however, it became practicable to manufacture sufficiently pure and potent preparations of the luteinizing hormone which is formed in the chorionic epithelium and probably is free from any admixture of FSH. The clinical employment of this hormone has now been mastered, and favorable results are obtained with ChG therapy in lesions due to hypofunction of progesterone (corpus luteum hormone) and androgen, respectively — *e. g.*, irregular endometrial hyperplasia, certain forms of amenorrhea, adiposogenital dystrophy, cryptorchidism and other forms of hypogenitalism. In either sex it promotes the development of the secondary sex characters.

On the other hand, no pure preparation of FSH is yet available, and thus we have no entirely satisfactory remedy for lesions due to defective formation of this hormone — *e. g.*, sterility in either sex, hypertrophy of the prostate, and primary amenorrhea. Pregnant mare serum, it is true, has yielded a preparation — serum gonadotropin (SG) — which contains a mixture of FSH and LH; but the quantitative proportion of the two hormones is not known exactly. It appears as if LH is the dominating component of this preparation — at any rate, it is not FSH in pure form.

Really, we have to admit that today — seventeen years after the discovery of the gonadotropic hormones — we have reached only half the way to their clinical utilization. For the therapeutic effect of these hormones cannot be utilized

fully till we have at our disposal a preparation which contains no LH, but sufficient amounts of FSH.

As in animal experiments it is difficult to distinguish between the effects of FSH and LH on the ovary, which hitherto has been employed exclusively for biological standardization of the gonadotropins, we found it desirable also to analyze more thoroughly the effect of these hormones on the testis, which has proved more suitable for this purpose.

After *Zondek* had shown the gonadotropic hormones to be sexually unspecific, he and several others investigated first their effect on the ovary thoroughly. But, already in 1928, *Steinach & Kun* demonstrated that ChG has a stimulating effect on the interstitial tissue of the testicle and on the secondary sex characters. In 1930 *Boeters* reported the first fairly comprehensive and systematic studies on the effect of the gonadotropic hormones in the male organism. He found that these hormones produced a marked increase in the weight of the gonads; he also demonstrated that the rat is more sensitive to their action than is the mouse. In the following years these findings were confirmed by many authors. In 1934 *Smith, Engle & Tyndale* emphasized the gametokinetic action of FSH in hypophysectomized infantile males; and they also pointed out that ChG acts in particular on the interstitial tissue. Finally, these authors reported as the result of their experiments that the interstitial tissue alone produces the male sex hormone. *Evans* and collaborators arrived at a similar result and stated that distinction has to be made between two separate gonadotropins: one with gametogenetic activity, stimulating the production of male germ cells, and another which stimulates the production of testicular hormone. These findings were confirmed by *Kemp* (1938) on mice with pituitary dwarfism. In 1939 *Fevold* gave a method for separation of FSH from LH in pituitary extract from sheep; on the basis of his experimental findings he asserted that it is the same substance which gives luteinization in the ovary and growth of the interstitial tissue in the testis.

Still, no quite thorough and systematic investigation of the question has not been presented yet. For this reason, we have taken it up for further study. In our experimental studies on the effect of gonadotropic hormones on the testicle the following preparations were employed:

1. Chorionic gonadotropin in the form of Physex (Leo),

which is purified so that it contains about 30,000 I. U. per g (addition of lactose).

2. Serum gonadotropin in the form of Antex (Leo) which is purified so that it contains about 20,000 I. U. per g (addition of lactose). It is a mixture of FSH and LH.

3. Equine pituitary extract (EPF), containing mostly LH, so that 1 mg produces luteinization in the rat ovary.

4. Castrate gonadotropin (ClG) obtained from the urine of climacteric women, containing mostly FSH, so that 1 mg nearly doubles the ovarian weight in infantile mice and induces estruation in 50 % of the animals.

Thus four different hormonal preparations were employed, two of which (No. 1 and 3) contained pure or almost pure luteinizing hormone, obtained respectively from chorionic tissue and from the pituitary. The preparation No. 4 contained chiefly FSH, but also a little LH; and No. 2 contained a mixture of FSH and LH.

These preparations were tried out on the following groups of animals.

1. Infantile male rats, 10 and 20 days old.

2. Hypophysectomized male rats, about one month and six months after the hypophysectomy.

3. Male mice with a hereditary defect of the anterior pituitary lobe.

The results of the experiments are recorded in Tables 1—3.

In estimating the testicular changes, the organs of treated animals were always compared with the organs from the corresponding controls. In the tubules the number of cell layers was counted, and the process of spermatogenesis was estimated. The hypophysectomized animals which were not treated till about half a year after the operation presented merely Sertoli cells in the tubules — or almost only such cells. The infantile animals showed also spermatogonia; with advancing maturity the number of cell layers was increased — up to about 10 — and when spermatogenesis took place, their number decreased again, leaving a wider or smaller lumen in the tubule. At the same time, more mature germ cells were seen:

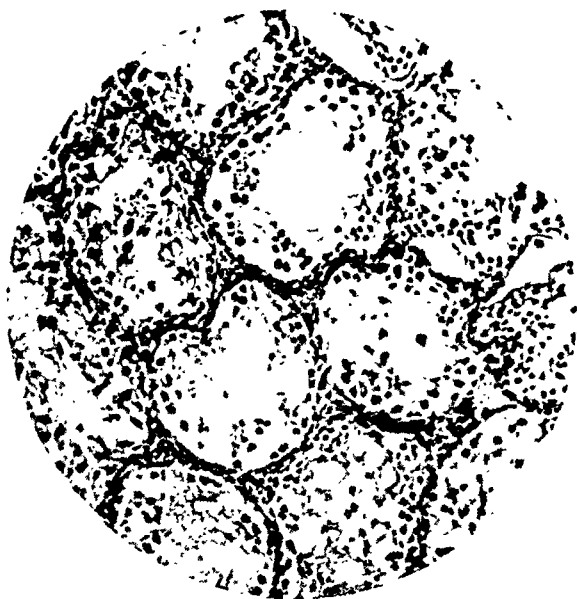
spermatocytes, prespermatids, spermatids, and fully developed spermatozoa. In the tables, »+ spermiogenesis« is recorded only on observation of fully mature spermatozoa. The number of Leydig cells is reckoned by rough estimate, and the presence of colloid between these cells is recorded too.

*Chorionic gonadotropin* has a distinct effect in all the

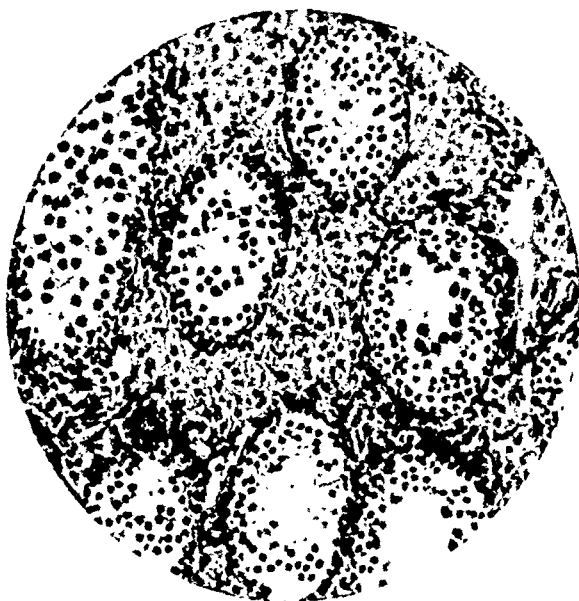
Table 1. *Infantile Rats.*

Exp. No.	No. of animals	Age in days at begin. and end of exp.		Preparation	Dosage	Testicular weight in mg.	Number of layers in tubules	Spermiogenesis	Leydig cells
1	10	10	26	Control		105	3—4	—	(+)
1	10	10	26	ChG	50U×15	242	3—4	—	+++
1	10	10	26	SG	50U×15	368	5—6	—	+++
1	10	10	26	ChG	50U	334	5—6	—	+++
				+SG	+50U×15				
2	5	10	31	Control		132	4—5	—	(+)
2	5	10	31	ChG	100U×20	377	7—8	—	+++
2	5	10	31	SG	100U×20	587	5—6	—	+++
							+lumen		
2	5	10	31	ChG	100U×20	453	5—6	—	++(+)
				+SG			+lumen		
3	2	20	36	Control		362	5—6	(+)	(+)
3	2	20	36	ChG	50U×15	582	5—6	—	+++
3	2	20	36	SG	200U×15	712	7—8	+(+)	++
3	2	20	36	ChG	50U	562	7—8	++(+)	++(+)
				+SG	+200U×15				
4	2	20	41	Control		380	6—7	+(+)	(+)
4	2	20	41	ChG	50U×20	710	6—7	+(+)	+++
4	2	20	41	SG	200U×20	764	7—8		
							++lumen	+++	++(+)
4	2	20	41	ChG	50U		7—8		
				+SG	+200U×20	844	++lumen	+++	++(+)
5	10	10	26	Control as Exp. 1		105	3—4	—	(+)
5	10	10	26	EPE	12,5 mg×15	258	4—5	—	++
5	10	10	26	EPE	25 mg×15	322	3—4	—	+++ <sup>1)</sup>
							++lumen		
6	10	10	26	Control as Exp. I		105	3—4	—	(+)
6	1	10	26	ClG	5 mg×15	434	7—8	+(+)	(+)
6	1	10	26	ClG	20 mg×15	524	7—8	++	(+)





*Fig. 1.*  
Testis of hypophysectomized rat.  $\frac{148}{1}$ .



*Fig. 2.*  
Testis of infantile rat, 10 days old, treated with 50 I.U. of chorionic gonadotropin daily for 15 days.

Table 2. Hypophysectomized Rats.

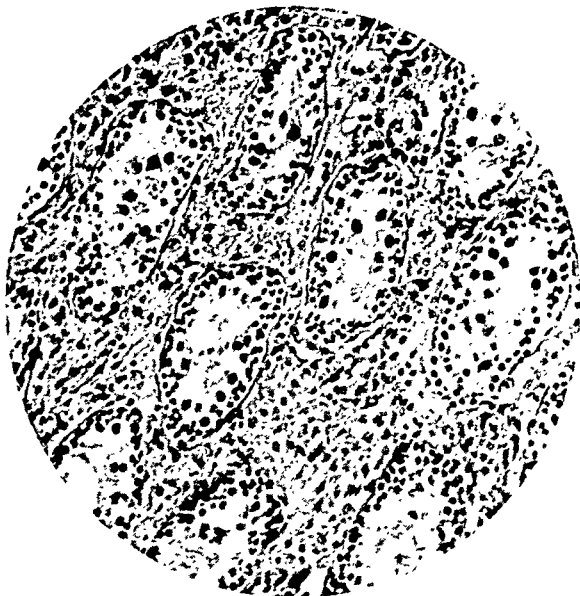
Exp. No.	No. of animals	Preparation	Dosage	Testicular weight in mg.	Number of layers in tubules	Spermiogenesis	Leydig cells
7	2	ChG	50U×20	213	3—4	—	+++
7	—	Control		84	1—2	—	(—)
7	2	SG	50U×20	631	6—7	(+)	++
7	—	Control		160	1—2	—	(—)
7	1	ChG	50U	643	8—10	(+)	++
		+SG	+50U×20				
7	—	Control		121	1—2	—	(—)
7	1	ChG	10U	219	4—5	—	++
		+SG	+10U×10				
7	—	Control		91	1—2	—	(—)
8	7	Control		67	1—2	—	(+)
8	1	ChG	50U×10	162	2—3	—	+++
8	2	SG	200U×10	117	4—5	(+)	++
8	2	ChG	50U	242	3—4	—	++
		+SG	+200U×10				
9	1	ChG	50U×20	403	4—5	—	+++ <sup>1)</sup>
9	1	Control		171	2—3	—	(+)
9	2	SG	50U×20	558	7—8	+(+)	+++ <sup>1)</sup>
9	2	Control		117	2—3	—	(+)
9	2	ChG	50U	512	5—8	(+)	+++ <sup>1)</sup>
		+SG	+50U×20				
9	2	Control		139	2—3	—	(+)
10	2	EPE	25 mg×15	372	3—4	—	++(+)
10	2	Control		163	2—3	—	(+)
11	1	ClG	25 mg×15	256	3—4 (lumen)	+(+)	(+)
11	1	Control		110	3—4	—	(+)
11	1	ClG	50 mg×20	310	6—7 (lumen)	++	++(+)
11	1	Control		152	4—5	—	(+)

Table 3. Dwarf Mice.

Exp. No.	No. of animals	Preparation	Dosage	Testicular weight in mg.	Number of layers in tubules	Spermiogenesis	Leydig cells
12	3	Control		29	3—4	+	—
12	2	ChG	50U×10	29	3—4	+	++
12	2	SG	200U×10	34	6—7	++	+

<sup>1)</sup> ++ Colloid between Leydig cells.

groups of animals examined. In the infantile rats, 10 days old, it has practically no influence on the seminiferous tubules, and no evidence of spermiogenesis is seen; but the Leydig cells develop enormously, so that the tubules appear as scattered islands in the interstitial tissue, the greater part of which



*Fig. 3.*

Testis of hypophysectomized rat, treated with chorionic gonadotropin, 50 I.U. daily for 20 days.

consists in characteristic epitheloid Leydig cells, with intercellular colloid in a few areas, and scanty connective tissue with a rather plentiful supply of blood vessels. In somewhat older infantile animals the effect of ChG on the tubules is more distinct, the cell layers numbering 7—8; but no spermiogenesis is seen. In these animals, too, the effect on the Leydig cells is enormous. Complete spermiogenesis is seen first when the animals on autopsy are 41 days old; and then it is not more pronounced here than in the corresponding control.

In hypophysectomized rats the testes undergo a marked atrophy, somewhat depending on the length of time that has

passed since the hypophysectomy. The tubules are lined merely with one or two layers of epithelial cells, between which a scanty connective tissue is seen to contain but exceedingly few characteristic Leydig cells. Administration of ChG gives a great increase in the testicular weight: in 20 days, from 84



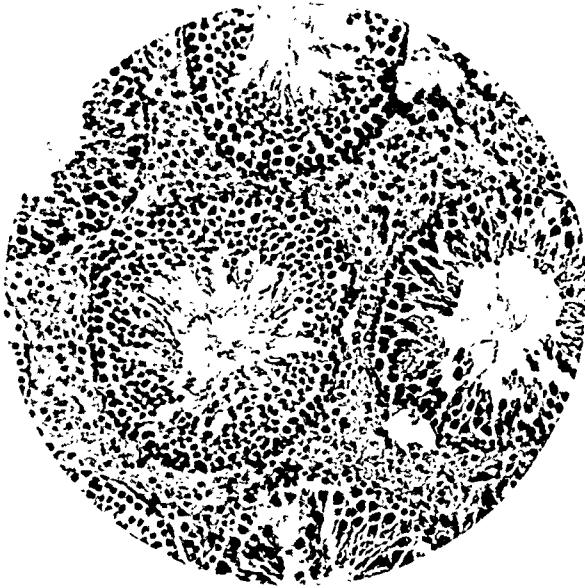
*Fig. 4.*

Testis of infantile rat, 10 days old, treated with 50 I.U. of serum gonadotropin daily for 15 days.

to 213 mg. The tubulus are affected but little or not at all, and the trebling of the testicular weight here observed is due practically to the hypertrophy of the Leydig cells alone, between which many interstices are filled with colloid. The dwarf mice show a similar effect: marked stimulation of the interstitial tissue.

*Serum gonadotropin*, too, has a very characteristic effect on the testis in infantile as well as hypophysectomized rats. The increase in testicular weight produced by SG is even more striking than the one produced by ChG. But the effect of SG is of a more complicated nature than that of ChG, especially

in older infantile animals and also in hypophysectomized rats which are given the treatment within a relatively short period after the operation. In the 10-day-old rats no complete spermiogenesis can be produced with SG given for 15 or 20 days. Distinct spermiogenesis may be induced by SG only in animals



*Fig. 5.*

Testis of infantile rat, 20 days old, treated with 200 I.U. of serum gonadotropin daily for 20 days.

which are so old that also the untreated controls at the same age show a suggestion of spermatogenesis; and yet no mature spermatocytes appear in these animals. The increase in the size of the testis is due in part to growth of the tubules, which become lined with several layers of cells and — in contrast to the controls — often have a large lumen. At the same time, the Leydig cells undergo a hypertrophy that is almost just as pronounced as on treatment with ChG.

The hypophysectomized animals present a similar effect from treatment with SG. The increase in the weight and size

of the testis is colossal, up to 5—6 times the initial size. The tubules grow considerably and become lined with 8—10 layers of cells — in contrast to 1—2 layers in the controls. When the treatment is instituted as late as 6 months after hypophysectomy, however, no quite mature spermatocytes can be



*Fig. 6.*

Testis of hypophysectomized rat, treated with serum gonadotropin, 50 I.U. daily for 20 days.

produced, whereas the production of mature spermatocytes may be obtained with this treatment when it is given within a considerably shorter period after the operation. The Leydig cells, on the other hand, are stimulated very strongly, almost to same extent as on administration of ChG. This fact is an additional proof that SG contains follicle-stimulating hormone as well as luteinizing — and perhaps even more of the latter. For small doses of SG produce a relatively stronger stimulation of the Leydig cells than of the seminiferous tubules. In

the dwarf mice SG has a stimulating effect on the tubules as well as on the Leydig cells.

*Combined treatment with ChG and SG results in an effect essentially similar to that of SG alone.*

*Equine pituitary extract, which contains relatively large*

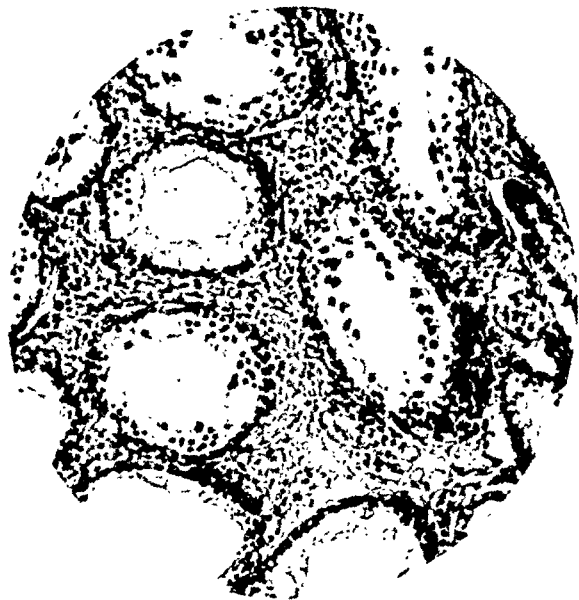


Fig. 7.

Testis of hypophysectomized rat, treated with 50 I.U. of chorionic gonadotropin + 50 I.U. of serum gonadotropin daily for 20 days.

amounts of luteinizing hormone, produces a distinct increase in the testicular weight both in infantile and hypophysectomized animals, doubling or trebling the weight when given in suitable doses. The seminiferous tubules are stimulated only a little under this treatment, showing no spermiogenesis whatever, whereas there is a marked increase in Leydig cells.

*Climacteric urinary gonadotropin* contains chiefly follicle-stimulating hormone but also very small amounts of luteinizing hormone — as is evident from control tests on infantile female mice. In our experiments, both infantile and hypo-

physectomized male rats treated with this preparation show a marked increase in the testicular weight — up to four or five times the control weight — and the stimulation involves predominantly the tubules, which become lined with many layers of cells, and a lumen appears in the tubules together



*Fig. 8.*

Testis of hypophysectomized rat, treated with climacteric gonadotropin, 50 mg. daily for 20 days.

with distinct spermiogenesis. The Leydig cells, on the other hand, are affected but little by this treatment, even though they are somewhat more developed in the treated animals than in the controls of the same age.

#### *Comments.*

The experiments here reported have given some very consistent results:

They strongly support the view that *chorionic gonado-*



*tropin* contains only luteinizing hormone and no follicle-stimulating hormone. In very young animals ChG stimulates only the Leydig cells, whereas the tubulus remain quite unaffected by the treatment — or their development is even inhibited by the enormous increase in interstitial tissue. In hypophysectomized animals the effect of ChG is also limited to the interstitial cells exclusively. When somewhat older infantile animals shows a distinct effect on the tubules under this treatment, this phenomenon undoubtedly is due entirely to the circumstance that the FSH production of the pituitary in such animals is increased. Obviously, then, it is quite useless — or perhaps even injurious — to employ ChG in the treatment of men for sterility from azoospermia. On the other hand, this hormone gives a very strong stimulation of the hormonal production from the Leydig cells, *i. e.*, a greatly increased androgen formation in the organism — as is also manifested by accentuated development of the secondary sex characters.

*Serum gonadotropin* has essentially a similar effect on the testis as exerted by chorionic gonadotropin. It induces a very considerable growth and increased functional capacity of the interstitial tissue together with a corresponding development of the secondary sex characters. But, in addition it has also a stimulating effect on the seminiferous tubules. In very young animals and in animals hypophysectomized long before the treatment, however, it is not able to produce complete spermiogenesis; and it cannot be excluded that the intense growth of the interstitial cells has an inhibitory influence on the tubules. In somewhat older infantile animals, in which the tubules have already attained a certain degree of development, it has a more pronounced effect, not only on the interstitial tissue but also on the tubules, in which complete spermiogenesis now appears under this treatment.

*Serum gonadotropin contains a mixture of FSH and LH in unknown quantitative proportion, and hence its clinical effect will always be uncertain.* In lesions involving complete abolition of the FSH production, SG may hardly be expected to have any favorable effect; but it cannot be excluded that

its employment may prove useful in morbid conditions involving merely a hypoproduction of FSH — *e. g.*, secondary amenorrhea and transitory sterility. On the other hand, the administration of SG may not be expected to have any influence on a sterility resulting from primary azoospermia.

A combination of ChG and Sg may hardly offer any advantage, as such a preparation has essentially the same effect as SG alone.

While the therapeutic significance of SG, which is a mixture of FSH and LH, thus is rather limited, there can be no doubt that a preparation containing FSH alone would prove very valuable in the clinic. This is plainly evident from the experiments with *climacteric gonadotropin*, by means of which it was practicable in quite young animals to produce complete spermiogenesis, while the Leydig cells were stimulated only in a moderate degree.

Recently Törnblom, in Sweden, has claimed that two hormones are formed in the testis: one under influence of LH from the Leydig cells, another under influence of FSH from the tubules. The latter, he thinks, may possibly be estrogen (oestradiol); and, according to his findings, this hormone presumably has a favorable effect in hypertrophy of the prostate, which is affected in a similar way by the hormone of the Leydig cells. Accordingly, it would also be of great value in dealing with hypertrophy of the prostate to have available a pure preparation of FSH. According to the more recent investigations, on the whole, it seems highly probable that, through their different effects on the testis, FSH and LH differ also in their effect on the secondary male sex characters. Studies on this question will be published subsequently.

*It would be particularly desirable, then, to be able to manufacture a preparation containing FSH alone.* Such a preparation might conceivably be obtained in various ways: it might be made from climacteric urine, or it might be obtained by cleavage of serum gonadotropin, so that this preparation was freed from its LH content and thus consisted of FSH alone. Experiments with these and other possibilities are now

being carried out. As is evident from the studies here reported, such a hormonal preparation may be standardized more expediently on male animals.

### Summary.

The effect of the gonadotropic hormones in the male organism is investigated in infantile rats, hypophysectomized rats and dwarf mice.

Chorionic gonadotropin acts almost exclusively on the interstitial cells. Serum gonadotropin has a somewhat similar effect, although it stimulates also the seminiferous tubules, as it is a mixture of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. Climateric gonadotropin acts almost exclusively on the seminiferous tubules.

Efforts ought to be made to manufacture a pure follicle-stimulating preparation, and some ways of doing this are suggested.

### LITERATURE.

- Boeters, H.: Deutsche med. Wochenschr. 56, 1382, 1930.  
 Evans, H. M., Penchars, R. J. & Simpson, M. E.: Endocrinology 18, 617, 1934.  
 Fevold, H. L.: Endocrinology 24, 435, 1939.  
 — J. biol. Chem. 128, 83, 1939.  
 Hamburger, Chr.: Acta path. microbiol. scand. 18, 457, 1941.  
 Kemp, T.: Acta path. microbiol. scand. Suppl. 37, 290, 1938.  
 Rubinstein, H. S. & Radmann, H. M.: Am. Jour. Physiol. 122, 319, 1938.  
 Smith, P. E., Engle, E. T. & Tyndale, H. H.: Proceed. Soc. Exp. Biol. & Med., 31, 745, 1931.  
 Smith, P. E. & Engle, E. T.: Jour. Ped. 5, 163, 1934.  
 Steinach & Kun: Med. Klin. 14, 524, 1928.  
 Törnblom, M.: Nord. Med. 17, 346, 1943.  
 Zondek, B.: Hormone d. Hypophysenvorderlappens. Wien 1935.

## EXPERIMENTAL STUDIES ON THE RÔLE OF PLASMA CELLS AS ANTIBODY PRODUCERS

By *M. Bjørneboe* and *H. Gormsen*.

(Received for publication Sept. 22nd 1942).

Numerous investigators have tackled the problem: Where in the organism are the antibodies formed? The results of such studies are far from being consonant, falling largely into three groups, as antibodies are assumed to be formed either 1) by the reticulo-endothelial system — in the stricter sense of the term or, especially, in the broader sense (the macrophagocytic system), 2) by lymphatic cells, or 3) by plasma cells.

By far the most investigators think the antibody formation is ascribable to the reticulo-endothelial system (for reviews of the literature on this subject, see, for instance, Jaffé,<sup>16</sup> Bieling,<sup>2</sup> Sabin<sup>32</sup> and Kallós<sup>10</sup>).

The theories holding that the reticulo-endothelial system produces antibodies are founded in part on experiments with blockage of this system (with colloids and suspensions) or its destruction (*e. g.*, by means of colloidal copper (Jancsó<sup>17</sup>)), in part on experiments with antibody formation in tissue cultures of tissue rich in reticulo-endothelial elements. Finally, the hypotheses are based on observations under immunization of proliferation in various organs

---

Supported by grants from P. Carl Petersens Fond and Miss P. A. Brandts Legat.

of cells that are assumed to belong to the reticulo-endothelial system.

As to the first-mentioned experiments, the blockage and tissue culture, the results are even extraordinarily conflicting.

In immunizing experiments with a colored protein which could be observed directly in the phagocytal elements, Sabin<sup>32</sup> found that at the same time as the colored substance disappeared from the cells the experimental animals showed a commencing appearance of antibodies. Simultaneously the author observed a detachment of the ectoplasm from the macrophages, and she thinks from this that it is safe to conclude that the phagocytal elements are antibody producers, which are also assumed to form the normal serum globulins.

Concerning the above-mentioned second theory — that the lymphatic cells are the antibody producers — a comprehensive work has been published by Rich, Lewis & Wintrobe<sup>29</sup> (with a review of the literature). The authors, who immunized the animals with foreign protein, examined in tissue cultures the cells that proliferated in the spleen, which showed considerable hyperplasia. Besides proliferation of plasma cells, the authors observed especially proliferation of large mononuclear cells (»the acute splenic tumor cells«) which the authors thought they were able to identify as lymphatic elements because of their particular way of moving about in the tissue culture preparations; and the authors arrived at the conclusion that lymphatic cells are to be regarded as antibody producers.

In support of the last-mentioned theory — that plasma cells are antibody producers — only a very few experimental studies have been published so far. The hypothesis that plasma cells might be associated with processes of immunization has been advanced by many authors on the basis of pathologic-anatomical observations (*e. g.*, Huebsmann,<sup>15</sup> Klein<sup>21</sup>). In sternal punctates Gormsen<sup>9</sup> was able to demonstrate a proliferation of plasma cells in lesions associated with hyperglobulinemia (infections, agranulocytosis, serum sickness (Gormsen & Heintzelmann<sup>10</sup>) and other morbid conditions), affording clinical evidence in support of the hypothesis about plasma cells as antibody producers.

Additional evidence is presumably to be found in the observation reported by Mas y Magro<sup>24</sup> of plasma cell proliferation in the organism under experimentally produced anaphylactic reactions.

In rabbits Kolouch<sup>22</sup> demonstrated an increase in the plasma cell content of the bone marrow running parallel with a rise in the antibody titer against streptococcus viridans. Finally, in a previous paper mentioned below, dealing with histological changes

in rabbits immunized with polyvalent pneumococcus vaccine, we have observed a massive plasma cell proliferation in a considerable number of organs, coincident with a marked antibody production.

The observation of plasma cell proliferation in the organs, in particular, the spleen, during immunizing processes has been reported previously by other authors — for instance, by Azzi,<sup>1</sup> Rich,<sup>28</sup> Rich, Lewis & Wintrobe,<sup>29</sup> and Miller<sup>25</sup> in a work on changes in organs under immunization with tuberculo-proteins.

In a previous preliminary report<sup>6, 7</sup> as mentioned, we gave an account of the observation of an enormous plasma cell proliferation in the organs, especially the spleen, of rabbits in which a considerable degree of hyperglobulinemia was produced after the method given by Bjorneboe.<sup>4</sup> By intensive intravenous immunization with several pneumococcus types simultaneously in these experimental animals practically all the globulin (measured after Howe's method) was antibody protein, and we concluded that the plasma cells are most likely to play an important rôle in the antibody production.

In the present paper an account will be given of an extension of the above-mentioned serologic-histological studies<sup>6, 7</sup> on highly immunized animals. The aim of the present studies has been on a large material and with employment of various kinds of antigens — bacterial and non-bacterial — and various species of animals to test the hypothesis about the rôle of plasma cells as antibody producers and try to elucidate whether the correspondence between experimentally produced hyperglobulinemia and plasma cell proliferation is a constant phenomenon.

The results of the serological studies in the experiments to be reported here have been published already,<sup>5</sup> and hence the serological findings will not be discussed in detail here; they will merely be mentioned to the extent required for illustration of the experiments and for the conclusions concerning the relation between hyperglobulinemia (on the basis of antibody protein) and plasma cell proliferation which we think we are able to draw from our observations.

As in the preceding work we have employed a special technique in the immunization of the animals, namely: inten-

sive intravenous immunization with several different antigens simultaneously. As the production of antibody protein within certain limits is proportional to the number of antigens employed, this immunizing technique will result in quite considerable antibody concentrations.

The experiments were carried through with this immunizing technique for the following reasons: With the technique ordinarily employed in serological studies — injection of a single antigen, and only a few injections — the antibody concentration of the blood, measured as protein concentration, is very slight. At the most it represents merely a few percent of the total serum protein concentration. With the technique here employed the antibody concentration may rise to values amounting to about 70 % of the total protein concentration. Supposing that the antibody-producing cell system proliferates with increased production, such proliferation would presumably be difficult to ascertain on ordinary immunization, whereas it would be reasonable to expect a considerable and easily observable proliferation on employment of the technique adopted for the present studies.

### *Outline of the Experimental Plan.*

In the main experiment a large uniform group of rabbits were immunized with polyvalent pneumococcus vaccine. During the immunization, at regular intervals a rabbit was bled, killed and autopsied. The serum and organs were then examined chemically and histologically. In two subsequent smaller experimental series the immunization was carried out with polyvalent Salmonella vaccine and with a mixture of foreign proteins. These three experiments thus elucidate the antibody production in immunization with Gram-positive cocci, Gram-negative rods, and dissolved protein antigens.

Finally, a few supplementary experiments have been carried out in order to elucidate particular features of the immunization: immunization with monovalent vaccines (pneumococci and Pfeiffer bacteria), the significance of the spleen to

the antibody production, and the local skin reaction after intradermal injection of the antigen. Further, the question has been looked into whether it possibly might be a foreign body effect of the bacteria that gave rise to the plasma cell proliferation, some rabbits being examined histologically after numerous intravenous injections of India ink.

Further, we have looked into the question whether the appearance of the plasma cells might be secondary to the hyperglobulinemia. Passive hyperglobulinemia was produced by intravenous injection of rabbit globulin, and then the organs were examined for plasma cells.

Finally, we have tried to reproduce our experimental results in another species besides rabbits, namely, on guineapigs. But, in spite of numerous intraperitoneal and a few intravenous injections of polyvalent pneumococcus vaccine, we did not succeed in producing a measurable antibody formation the guineapigs nor in producing any rise in serum globulin in these animals.

### *Details of the Experimental Plan.*

#### A. Immunization with Polyvalent Pneumococcus Vaccine.

This experiment was carried out with 50 rabbits of the breed of the State Serum Institute (race: white Danish country rabbit). At the commencement of the experiment the rabbits weighed 2000—2100 g. and were 8—10 weeks old. During the experimental period their diet consisted in beets, hay and a little oats. Of these rabbits 40 (Nos. 2052—2091) were immunized, while 10 acted as controls (2042—2051). The pneumococcus vaccine consisted in a mixture of equal parts of Types 6, 9, 11, 13, 15, 17, 22 and 23. The vaccine was prepared as given by Kauffmann, Bjorneboe & Vammen<sup>20</sup> and stored at 4° C, with addition of 0.01 % merthiolate. The density of the vaccine was about 10<sup>9</sup> per cc. The initial dose of this vaccine was 2 cc. and all subsequent doses were 4 cc. By mistake, however, on the 15' day an



octuple dose was given:  $32 \times 10^9$  pneumococci. The injections were given into the ear vein every other day at 9—10 a. m. In order to follow the serological and anatomical changes from the very beginning of the immunizing process to the climax that might be reached with the immunizing technique here employed, an animal was killed, at first every day, later at intervals of a few days. Thus the immunizing process has been followed from 5 hours after the first injection to the 82' day. Finally, 3 animals were examined after 92 days' immunization plus a pause of 57, 80 and 111 days respectively.

The animals were examined in the following way: First they were weighed. Then they were killed by total bleeding under ether anesthesia, by division of the carotid artery. Autopsy was performed in the afternoon, between 14 and 15 o'clock. The weights of the liver and spleen were recorded, and blocks of tissue were taken from various organs for microscopic examination.

Altogether 9 animals died during the immunization: 1 on the 6' day of immunization, 1 on the 15', 2 on the 16', 1 on the 25', 1 on the 27', 2 on the 34' and 1 on the 35' day. In all nine cases the death occurred within the first 24 hours after the last injection of vaccine, as a rule at least 12 hours after the injection, under increasing general debility.

The controls were bled and autopsied at points of time that were distributed equally over the entire experimental period.

#### B. Immunization with Polyvalent Salmonella Vaccine.

For this experiment we employed a vaccine\*) consisting of a mixture of equal parts of the following Salmonella cultures: *Salmonella senftenberg*, *S. hvittingfoss*, *S. aberdeen*, *S. kirkee*, *S. cerro*, *S. poona*, *S. onderstepoort* and *S. urbana*. These Salmonella types were selected because they all differ

---

\*) The vaccine was kindly furnished us by Dr. F. Kauffmann.

as to O antigens. The cultures were grown on agar plate, suspended in saline and killed by addition of formalin. Before immunization, the vaccine was diluted to a density of about  $1.4 \times 10^9$  per cc.

The experiment was carried out on 10 rabbits of the above-mentioned breed, 7 of them were immunized (Nos. 8—10, 12—15), while 3 served as controls (Nos. 1—3).

The weight of the animals at the commencement of the experiment was 2800—3000 g., their age was 8—9 months. Their diet consisted in beets, grass and a little oats. The animals were given an intravenous injection of vaccine every other day, commencing with a dose of 0.02 cc. and then doubling the dose at each injection till it reached 2 cc. This dosage was then maintained for over 2 months. Each animal thus received a total dose of 40 cc. of vaccine (with exception of No. 8, which received only 36 cc.). The animals were bled and autopsied as outlined under A. The controls were autopsied at the same time as the immunized animals.

### C. Immunization with Foreign Proteins.

For this form of immunization we used a mixture of horse, sheep and ox sera. The mixture was adjusted so that it contained equal amounts of horse, sheep and ox protein. The protein concentration of the mixture was 4.81 %, namely: 2.19 % albumin and 2.62 % globulin.

Altogether 11 rabbits of the above-mentioned strain were employed for this experiment, 8 being immunized (Nos. 29—32, 36—39) and 3 serving as controls (Nos. 26—28). The weight, age and diet of these animals were the same as in Exp. B. Injections were given intravenously every other day, commencing with a dose of 0.1 cc. and increasing the dose gradually to 0.6 cc., with which the treatment was continued for nearly 2 months. After this, some of the animals were further immunized with a few doses of 3 cc. Thus, Nos. 29, 30, 31 and 32 received altogether 44.6 cg. of protein in the injections, while Nos. 36, 37, 38 and 39 received 93.6 cg. of protein. The bleeding and autopsy were carried out as in

Exp. A and B. The controls were bled and autopsied at the same time as the immunized animals.

*Chemical and Histological Examination of the Animals,  
Exp. A, B and C.*

The blood of the animals was centrifuged after coagulation and the serum stored at 4° C, with an addition of 0.01 % merthiolate. All the sera were examined for total protein, globulin and albumin after Henriques & Klausen's method. Sera A and B were further examined for antibody protein after Heidelberger & Kabat's method. *All analyses* were carried out in duplicate. Further, the agglutination titers for sera from Group A were determined in the usual way. As to details of these examinations, the reader is referred to a previous paper.<sup>4</sup>

On autopsy blocks of tissue were taken for histological examination of the liver, kidneys, spleen, suprarenals, lungs and lymph glands, thymus and skin, besides bone marrow from the femur and, in several cases, sections of the small intestine and meninges. The tissues were fixed at once in Helly's fluid, and embedded in paraffin. The sections were stained with hematoxylin-eosin and after Unna-Pappenheim's method. In a good many cases the sections were further stained after Gram's method, and after this method as modified by Vilhelm Jensen. Smears were made from the bone marrow and stained after May-Grünwald-Giemsa method for counting of plasma cells per 500 nucleated cells. At the autopsy, furthermore, blood smears were made from all the animals.

We divided the work between us as follows: One of us (Bjørneboe) performed the immunization, bleeding and autopsy on the animals and examined the sera. The other (Gormsen) took care of the histological preparations and examined the sections without any knowledge of the serological changes the animals had presented, and without knowing whether the organs came from treated animals or controls.

## D. Supplementary Experiments.

### 1) Immunization with Monovalent Vaccines.

a) *Pneumococci*. 3 rabbits (Nos. 40, 41, 43), (breed, age, weight and diet as in Exp. B and C), were immunized with pneumococci of Type 4 given in doses of  $4 \times 10^9$  pneumococci intravenously every other day for 3 weeks. The animals were examined as in Exp. A and B.

b) *Pfeiffer bacilli*. 2 rabbits (2032 and 2034) were immunized for 2 and  $2\frac{1}{2}$  months respectively with formalin-killed Pfeiffer bacilli, injections of about  $1.6 \times 10^9$  bacteria being given intravenously every other day. After Howe's method the amount of serum proteins were then determined, together with the agglutinin titer of the sera. Histological examination as described above.

### 2) Significance of the Spleen under Immunization.

2 rabbits (45 and 46), (breed, age, weight and diet as in Exp. B and C), were splenectomized and subsequently immunized as in Exp. A for 3 weeks, whereafter they were examined as in Exp. A and B. On 2 other rabbits (52 and 54) splenectomy was performed after 3 weeks' immunization, and then the immunization was continued for 5 weeks. After this, the animals were examined as described above. One normal rabbit (55) served as control and was autopsied simultaneously with the other rabbits.

### 3) Local Reaction to the Antigen.

For observation of the histological changes associated with local antigen-antibody processes, a rabbit (breed, age, weight, diet as in Exp. B and C) was given intracutaneous injections (0.1 cc) of the polyvalent pneumococcus vaccine in 5 areas on one side of the back. On the other side of the back, in the corresponding areas, the animal was given intracutaneous injections of 0.1 cc. of 0.9 % saline with an addition of 0.01 %

merthiolate. Biopsy was now performed on these skin areas respectively 2, 4, 8, 13 and 18 days after the injection, so that field No. 1 injected with vaccine was examined simultaneously with field No. 1 injected with saline, and so on.

Similar examinations were carried out on a rabbit after intracutaneous injection of cowpox vaccine,<sup>\*)</sup> but in this case the biopsy was performed only on the 4' day after the injection — at which juncture, according to Ørskov & Kragh Andersen,<sup>35</sup> an abundant amount of antibody should be present in the skin.

#### 4) *Foreign Body Effect and Plasma Cell Proliferation.*

3 rabbits (2038, 2039 and 2040) were given intravenous injections of 0.5 cc. of India ink every other day for 2 weeks, 3 months and 3 months respectively. The animals were examined respectively 3, 6 and 6 days after discontinuance of the injections in the same way as the animals in 1) b.

#### 5) *Plasma Cell Proliferation Secondary to Hyperglobulinemia?*

In 4 rabbits (70, 71, 72 and 74) (breed, age, weight, diet as in Exp. B and C) »passive« hyperglobulinemia was produced by intravenous injection of 90 cc. of a rabbit serum globulin solution (concentrated rabbit antipneumococcus serum Type 1) within a period of 5 days. The animals were bled and autopsied respectively 1, 4, 5 and 10 days after the last injection of globulin.

### *Experimental Results.*

Before reviewing the experimental results proper, it will be appropriate to mention a few *normal anatomical features of the rabbit* of interest in this connection, namely: the *weight of the spleen and the occurrence of plasma cells in the organs.*

<sup>\*)</sup> Kindly furnished us by Miss E. Kragh Andersen, Laborator. Pharm. M.

The 17 untreated rabbits, which were all perfectly healthy, are looked upon as standard normal animals.

For the controls weighing about 2000 g. (Exp. A) the *average weight of the spleen* was 0.9 g. (0.5—1.6 g.); for the normal rabbits of about 3000 g. (Groups B, C and D2) it was 1.3 g. (0.8—2.3 g.).

The microscopic examination covered all the above-mentioned organs in the controls as well as in the treated animals. In the microscopic examination the principal interest was attached to the *plasma cell contents of the various organs* (recorded in Table 1 and 2).

In a greater majority of the animals the *liver* contained no plasma cells, but 5 of the 17 controls showed scanty amounts of scattered plasma cells together with a few lymphocytes in the portal spaces. Also the capillaries showed now and then a few plasma cells. The symbol (+) signifies the scanty occurrence of plasma cells, which thus has to be looked upon as normal. In one control (2043) the capillaries of the liver contain a few large multinuclear giant-cells, sometimes surrounded by a few lymphocytes and plasma cells. These giant-cells did not resemble megakaryocytes but showed rather some resemblance to foreign body giant-cells. The *kidney tissue* and the *adipose tissue in the renal sinus* were free from plasma cells in all the controls; and only in one normal animal did the *suprarenals* show a scanty pericapillary round-cell and plasma cell infiltration in the border zone between the cortex and medulla (+). In the *spleen*, on the other hand, a slight plasma cell infiltration (+) appears to be very common in normal rabbits. Only in 4 out of the present 16 normal animals were plasma cells in the splenic tissue so exceedingly scarce that the spleen could properly be designated as 0, although the spleen in no instance was positively free from plasma cells.

The *bone marrow* of the femur had about the same appearance in most of the normal animals with regard to its cell contents, being fairly rich in cells (»med.« = medium), while in 3 animals it was somewhat poor in cells (»hypo.« = hypoplastic). The plasma cell count in smears of femoral bone marrow was found to be less than 1 % in all the control animals.

In the *lungs* a scanty perivascular plasma-cell infiltration, (+), was a frequent finding (7 of the 17 animals presented this phenomenon).

Table  
Survey of Serological and Anatomical

Animal No.	Day of immunization or immunization period in days	Weight on autopsy in grams	Splenic weight in grams	Splenic weight in % of the average weight	Serum protein %	Albumin %	Globulin %	Antibody protein %	Agglutinin titer
2042 C <sup>1)</sup>	(0) <sup>2)</sup>	2040	0.8	0.039	4.68	3.63	1.05	0	0
2043 C	(8)	1920	1.2	0.059	5.04	4.13	0.91	0	0
2044 C	(15)	2040	1.0	0.049	6.09	4.59	1.50	0	0
2045 C	(24)	2120	1.0	0.049	5.82	4.49	1.33	0	0
2046 C	(32)	2015	0.6	0.029	6.45	4.65	1.80	0	0
2047 C	(40)	2125	0.5	0.024	6.68	5.35	1.33	0	0
2048 C	(48)	2170	1.2	0.059	6.91	5.06	1.85	0	0
2049 C	(69)	2230	0.6		6.39	4.74	1.65	0	0
2050 C	(83)	2370	1.6		6.68	5.09	1.59	0	0
2051 C	(203)	2640	0.8		6.38	5.19	1.19	0	0
2052	1	1990	0.8	0.039 <sup>4)</sup>	4.36	3.98	0.38	0	0
2053	2	1980	0.7	0.034	5.73	4.96	0.77	0	0
2054	3	2065	1.8	0.088	6.31	5.59	0.72	0	0
2055	4	2005	1.6	0.078	4.99	4.45	0.54	0	0
2056	5	1900	3.0	0.146	4.22	3.57	0.65	0	4
2057	6	1890	3.4	0.166	4.93	4.06	0.87	0	4
2058	7	2005	1.5	0.073	5.07	3.73	1.34	0.13	32
2059	8	1880	3.9	0.190	4.96	3.72	1.24	0.17	32
2060	9	1965	1.8	0.088	5.68	4.28	1.40	0.17	32
2061	10	1820	1.8	0.088	4.61	0.50	4.11	0.26	20
2062	11	1870	4.8	0.234	5.98	0.63	5.35	1.38	80
2063	12	1875	3.6	0.176	5.60	3.30	2.30	0.99	80
2064	13	1880	4.1	0.200	6.94	2.78	4.16	2.59	320
2065	14	1940	3.2	0.156	6.20	3.05	3.15	1.41	160
2066	16	1870	2.2	0.107	6.18	3.89	2.29	0.74	160
2067	18	2230	2.1	0.102	6.19	3.93	2.26	1.08	80
2068	20	1885	3.8	0.185	9.65	3.27	6.38	4.27	640
2069	23	1670	4.1	0.200	10.03	2.96	7.07	6.16	1280
2070	26	2250	2.3	0.112	9.01	4.03	4.98	3.02	320
2071	27	1860	2.2	0.107	7.82	3.58	4.24	2.68	320
2073	29	1530	3.0	0.146	6.31	3.25	3.06	1.98	640
2074	30	1850	3.3	0.161	7.21	3.29	3.92	2.93	320
2076	31	1710	5.0	0.244	7.95	2.28	5.67	4.72	640
2077	34	2020	2.8	0.137	7.38	3.70	3.68	2.43	320
2082	41	1900	2.4	0.117	7.54	3.16	4.38	2.75	640
2083	47	1620	2.9	0.142	6.16	2.63	3.53	2.43	640
2084	68	2650	2.5		6.94	4.25	2.69	1.91	1280
2086	82	2045	3.6		7.29	3.48	3.81	2.54	2560
2087	92+57 <sup>3)</sup>	2950	1.0		5.45	4.51	0.94	0.11	40
2089	92+803 <sup>3)</sup>	1900	0.5		5.23	3.99	1.24	0.07	32
2091	92+111 <sup>3)</sup>	2130	1.0		6.66	4.79	1.87	0.06	6

<sup>1)</sup> C = control animal.

<sup>2)</sup> Figures in parentheses refer to the day of

<sup>3)</sup> The last figure gives the number of day

<sup>4)</sup> Of the controls during the first 6 weeks

## Findings in Exp. A.

Animal No.	Amount of plasma cells in:											
	Liver	Kidneys	Suprarenals	Spleen	Bone marrow (total cell content)	Bone marrow	Lungs	Lymph nodes	Thymus	Skin	Intestine	Total result (plasma cell reaction)
2042	0	0	0	0	med.	<10 <sub>0</sub>	0	0	0	0	0	0
2043	(+)	0	(+)	(+)	med.	<10 <sub>0</sub>	(+)			(+)		0
2044	0	0	0	(+)	med.	<10 <sub>0</sub>	(+)			0		0
2045	0	0	0	(+)	hypo.	<10 <sub>0</sub>	0			(+)		0
2046	0	0	0	0	med.	<10 <sub>0</sub>	(+)			(+)		0
2047	0	0	0	(+)	hypo.	<10 <sub>0</sub>	0			(+)		0
2048	(+)	0	0	(+)	med.	<10 <sub>0</sub>	(+)		0	0		0
2049	(+)	0	0	(+)	med.	<10 <sub>0</sub>	(+)			0		0
2050	(+)	0	0	(+)	med.	<10 <sub>0</sub>	0		0	0		0
2051	0	0	0	(+)	med.	<10 <sub>0</sub>	0	(+)	0	0	+	0
2052	0	0	0	(+)			(+)			(+)		0
2053	0	0	0	0	med.	<10 <sub>0</sub>	0					0
2054	(+)	0	0	(+)	med.	<10 <sub>0</sub>	(+)			(+)		(+)?
2055	(+)	0	(+)	(+)	med.	<10 <sub>0</sub>	(+)					(+)
2056	(+)	0	0	(+)	med.	<10 <sub>0</sub>	(+)			(+)		(+)?
2057	+	(+)	(+)	+	hyper.	<10 <sub>0</sub>	+			(+)		+
2058	+	(+)	+	+	med.	10 <sub>0</sub>	++			(+)		+
2059	+	(+)	(+)	+	med.	<10 <sub>0</sub>	(+)					++
2060	++	0	0	+	med.	20 <sub>0</sub>	+			(+)		++
2061		++	+	++	hyper.	20 <sub>0</sub>	+			(+)		++
2062	++	(+)	+	++	hyper.	20 <sub>0</sub>	++			(+)		++
2063	++	++	(+)	++	hyper.	20 <sub>0</sub>	+					++
2064	+++	++	++	+++	hyper.	60 <sub>0</sub>	++	(+)		+		+++
2065	++	(+)	0	+++	hyper.	40 <sub>0</sub>	++			(+)		+++
2066	+	+	0	++	med.	40 <sub>0</sub>	+			+		++
2067	++	(+)	(+)	+	med.	40 <sub>0</sub>	++			(+)		++
2068	++	+	0	+++	med.	70 <sub>0</sub>				(+)		+++
2069	++	++	(+)	++	hyper.	50 <sub>0</sub>	++			(+)		++
2070	+	+	0	++	med.	40 <sub>0</sub>	++			(+)		++
2071	+	++	0	++	hyper.	50 <sub>0</sub>	++			(+)		++
2073	(+)	++	(+)	++	med.	40 <sub>0</sub>	+			(+)		++
2074	+	++	(+)	+++	hyper.	40 <sub>0</sub>	++			(+)		+++
2076	++	++	+	+++	hyper.	50 <sub>0</sub>	+++			(+)		+++
2077	+	(+)	(+)	++	med.	40 <sub>0</sub>	++					++
2082	+	+	(+)	++	med.	10 <sub>0</sub>	++			(+)		++
2083	++	+	(+)	++	hyper.	10 <sub>0</sub>	++			(+)		++
2084	+	0	0	++	med.	10 <sub>0</sub>	++	+	0	(+)		++
2086	(+)	+	0	+	hyper.	<10 <sub>0</sub>	+		0	(+)		+
2087	0	0	0	0	med.	<10 <sub>0</sub>	0	(+)	0	0		0
2089	0	0	0	0	med.	<10 <sub>0</sub>	0		0	(+)		0
2091	0	0	0	(+)	med.	<10 <sub>0</sub>	(+)	(+)	0		+	0

immunization when the animal was examined.  
after the discontinuance of immunization.  
the experimental period, that is 2050 g.



In the *lymph nodes* — retroperitoneal, mesenteric and mediastinal — the amount of plasma cells varied greatly (0 — +), and a very massive plasma cell infiltration was a frequent finding in the medullary cords.

The *thymus*, on the other hand, appeared to be free from plasma cells in all the animals.

The *skin* showed almost constantly scanty amounts of plasma cells here and there, together with lymphocytes, round the capillaries in the corium.

In the *small intestine* the lamina propria mucosae showed greatly varying amounts of plasma cells (0 — +++), generally abundant amounts.

As it hardly would be possible to carry through any exact objective quantitative estimation of the degree of plasma cell proliferation in the organs in the treated animals — apart from the plasma cell count in smears from the bone marrow — in Tables 1 and 2 we have recorded the amount of plasma cells simply by means of the following six designations based on a subjective judgment: 0, (+), +, ++, +++ and ++++. Except in the case of the spleen, as mentioned above, 0 signifies that the organ is free from plasma cells. (+) means that this degree of plasma cell infiltration cannot be looked upon as abnormal in the liver, suprarenals, spleen, lungs, lymph nodes and skin; and in the intestine the plasma cell infiltration may normally be so massive that it is impracticable to draw any conclusion from the amount of plasma cells here in the treated animals. Otherwise, a plasma cell infiltration of the degrees (+), +, ++, +++ and ++++ may be considered abnormal.

The total result of the histological examination with regard to plasma cell reaction in the animals is expressed by means of the same 6 symbols (Tables 1 and 2).

#### *Serum Proteins in Normal Rabbits.*

The average serum protein concentration in the 17 control rabbits was 6.03 % (minimum: 4.68 %; maximum: 6.91 %). The serum globulin concentration was on an average 1.23 % (min.: 0.48 %; max.: 1.85 %). Thus a globulin concentration exceeding 2 % may be reckoned as pathological. On an average, the globulin concentration was a little higher — 1.42 % — in the younger rabbits (2042—2051) than in

the older ones (1—3, 26—28 and 55) in which it was 0.95 %. The average serum albumin concentration was 4.81 % (min.: 3.63 %; max.: 5.56 %).

#### A. Serological and Anatomical Findings in the Rabbits Immunized with Polyvalent Pneumococcus Vaccine (Nos. 2052—2091) (Table 1).

##### *Serological Findings.*

Globulin concentration: During the first days of immunization the globulin concentration was lowered a little. From the 9' day an abrupt increase set in, and throughout the rest of the immunization period the globulin concentration kept being increased considerably, up to 7.07 %. At the same time the serum protein concentration increased, up to 10.03 %. After discontinuance of the immunization the globulin concentration returned again to a normal level. Calculation of the average difference between the globulin concentration and the antibody protein concentration for all the treated animals in Group A gives 1.35 %. The average globulin concentration for the controls in Group A is 1.42 %. Thus the concentration of *normal* globulin remains unchanged in the treated animals, and the antibody formation has to be looked upon entirely as an extra production of globulin (this holds true, however, only when the globulin concentration is determined after Henriques & Klausen's method (see 5)).

After a brief and slight initial rise, the serum albumin concentration was somewhat lowered throughout the immunization period.

##### *Anatomical Findings.*

*Weight of the spleen.* From the 3' day of immunization — or, at any rate from the 5' day, *i. e.*, before any antibody formation could be demonstrated in the animals — the spleen commenced to show a considerable increase in weight. From

this point of time, all the spleens weighed considerably more than normally, up to 6 times the normal weight (max. 5 g.). Even though the splenic weights vary somewhat, and there is no absolute parallelism between the values for antibody protein and splenic weights, the increase in splenic weight corresponds largely to the amount of antibody (increase in serum globulin (in the treated animals (see p. 674 and Fig. 1).

*The weights of the liver*, on the other hand, showed no unquestionable difference between the findings in the controls and in the treated animals.

The *lungs* in the immunized animals presented distinct macroscopic changes. They were larger and of firmer consistency than the lungs of the controls. In contrast to the pink lungs of the controls, they were greyish red in color.

### *Microscopic Examination.*

The results of the microscopic examination of the organs are evident from Table 1.

On the 1' and 2' days of immunization the organs present no abnormality; on the 3'—5' days of immunization a moderate plasma cell proliferation is seen in the liver (both in the capillaries and in the portal spaces), spleen and lungs — and in one animal, in the suprarenals, too. From the 6' day all the organs examined present a distinct plasma cell proliferation that increases in intensity until about the 13' day of immunization, whereafter it keeps fairly constant till the 68' day — at any rate, till the 31' day of immunization. In the 5 animals (2077, 2082, 2083, 2084, 2086) that were immunized longer than 31 days the plasma cell proliferation in the organs is somewhat less massive than in the animals immunized for up to 31 days; and it is a peculiar fact that the animal which was immunized for the longest period (No. 2086) shows merely a moderate plasma cell proliferation. In these 5 long-time immunized animals, however, the antibody and globulin concentrations are considerable.

The apparently less intensive plasma cell proliferation in

these five animals might perhaps be taken to indicate that the height of the capacity of the organism for plasma cell reaction to the antigens employed was passed round the 30' day of immunization and that the »plasma cell apparatus« of the organism has been »exhausted«. But it may be, however, that the less intensive plasma cell reaction in these five animals merely results from individual differences in the reactivity of the various animals as is evident from the fact that also a few of the animals immunized for less than 31 days (2066, 2067, 2070 and 2071) show a somewhat lesser degree of plasma cell proliferation than do the other treated animals. The latter explanation seems more likely to be correct, as in our previous studies<sup>6, 7</sup> we found a very considerable plasma cell proliferation in animals immunized for up to 26 weeks.

In the 3 animals examined 2—3½ months after the immunization (Nos. 2087, 2089 and 2091), the organs are normal.

Of the highly immunized animals 8 (Nos. 2058, 2064, 2068, 2071, 2074, 2077, 2082 and 2083) show more or less abundant amounts of the giant-cells in the liver capillaries mentioned above under the normal organs.

The figures obtained in plasma cell count on smears of the bone marrow correspond very well to the findings in the other organs. All told, however, the plasma cell proliferation in the bone marrow has to be characterized as relatively slight in comparison to the findings in the other organs. Still, there appears to be some hyperplasia of the bone marrow in some of the highly immunized animals.

On the whole, this group of animals show complete parallelism between the degree of plasma cell proliferation — which, as mentioned before, was determined without any knowledge of the protein values — and the globulin and antibody content of the serum.

Table  
Survey of Serological and Anatomical

Animal No.	Day of immunization or immunization period in days	Weight on autopsy in grams	Weight of spleen in grams	Weight of spleen in % of average weight	Serum protein %	Albumin %	Globulin %	Antibody protein %
1 C	(110)	3130	1.0	0.033 <sup>1)</sup>	5.46	4.88	0.58	0
2 C	(117)	3030	1.4	0.046	5.51	4.74	0.77	0
3 C	(119)	3000	0.8	0.026	6.41	4.91	1.50	0
8	110	2640	5.2	0.170	7.89	3.79	4.10	3.16
9	117	3070	3.9	0.128	6.26	3.93	2.33	0.97
10	119	2880	3.4	0.111	7.11	4.68	2.43	1.44
12	120	2520	7.3	0.239	10.13	2.27	7.86	6.38
13	120	2600	3.0	0.098	7.58	4.21	3.37	2.56
14	123	3180	4.9	0.161	9.11	3.88	5.23	4.44
15	123	3080	2.1	0.069	6.95	3.85	3.10	1.97
26 C	(61)	3360	1.3	0.041 <sup>2)</sup>	5.16	4.68	0.48	
27 C	(61)	3140	2.3	0.073	6.22	4.71	1.51	
28 C	(88)	2950	1.1	0.035	6.28	5.31	0.97	
29	59	3180	1.6	0.051	6.43	4.66	1.77	
30	59	2935	2.4	0.076	7.18	4.40	2.78	
31	61	3200	1.9	0.060	5.32	4.71	0.61	
32	61	3160	2.2	0.070	5.85	4.43	1.51	
36	82	3120	1.8	0.057	7.38	5.11	2.27	
37	88	3020	3.6	0.014	7.70	4.59	3.11	
38	88	3140	1.6	0.051	7.29	4.88	2.41	
39	88	3255	1.3	0.041	7.03	5.30	1.73	
40	21	3215	3.8		6.69	4.38	2.31	1.50
41	21	3540	3.1		7.38	3.56	2.82	2.13
43	21	3280	2.4		6.50	4.25	2.25	1.56
45	67	3465			7.81	4.94	2.87	
46	67	3635			7.38	4.63	2.75	
52	21	3350			7.19	5.06	2.13	
54	21	3135			6.69	4.50	2.19	
55 C <sup>3)</sup>	0	3460	1.1		6.38	5.56	0.82	
70		2540	3.9		6.44	3.78	2.66	
71		2560	4.5		7.25	4.59	2.66	
72		2515	5.2		6.34	4.21	2.13	
74		2875	2.1		6.38	5.00	1.38	
2032	60	ca. 3000			7.13	5.19	1.94	
2034	75	ca. 3000			6.31	4.37	1.94	
2038	14 <sup>4)</sup>	ca. 3000			5.88			
2039	90 <sup>4)</sup>	ca. 3000	2.8		6.63	5.50	1.13	
2040	90 <sup>4)</sup>	ca. 3000	2.1		5.81	4.44	1.37	

<sup>1)</sup> Of the normal animals, *i. e.*, 3050 g.

<sup>2)</sup> Of the normal animals, *i. e.*, 3150 g.

<sup>3)</sup> Control.

<sup>4)</sup> Duration of India ink injection in days.

<sup>5)</sup> Pneumonia.

Animal No.	Amount of plasma cells in:											
	Liver	Kidneys	Suprarenals	Spleen	Bone marrow (total cell content)	Bone marrow	Lungs	Lymph nodes	Thymus	Skin	Intestine	Total result (plasma cell reaction)
1	0	0	0	0	med.	<1%	0		0	0		0
2	0	0	0	(+)	med.	<1%	0	(+)	0	0		0
3	0	0	0	(+)	med.	<1%	0	+	0	0	+++	0
8	+++	+++	+	+++	med.	5%	++	+		(+)		+++
9	+	+	0	+++	hyper.	3%	++	+		(+)		++
10	+	+	(+)	+++	med.	3%	++	+	(+)	(+)	++	++
12	+++	+++	+++	++++	med.		++	+++	(+)	(+)	++	++++
13	+	(+)	(+)	+++		3%	+	++	0	(+)	++	++
14	+	+	(+)	+++	med.	2%	+	+	0	0	++	++
15	(+)	0	0	+	med.	2%	(+)	++	0	0	++	+
26	0	0	0	(+)	med.	<1%	(+)	+	0	(+)	(+)	0
27	(+)	0	0	(+)	med.	<1%	(+)	(+)	0	(+)	++	0
28	0	0	0	0	hypo.	<1%	0	(+)	0	(+)	+	0
29	0	(+)	0	(+)	med.	<1%	(+)	(+)	0	(+)	+	0
30	+	+	0	+	med.	2%	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+
31	(+)		0	(+)	med.	<1%	(+)	(+)	0	(+)	+	(+)
32	0	0		0	med.	<1%	0	0	0	(+)	++	0
36	(+)	+	0	(+)	med.	<1%	(+)	+	0	(+)	+	(+)
37	+	0	0	+	med.	<1%	(+)	(+)	(+)		(+)	+
38	0	0	0	(+)	med.	<1%	(+)	(+)	0	0	(+)	0
39	(+)	0	0	(+)	med.	<1%	(+)	(+)	0	(+)	+	0
40	0	0	0	(+)	hyper.	<1%	(+)	+	0	(+)	+	0
41	(+)	0	0	+	med.	1%		(+)	0	(+)	+	+
43	(+)	(+)	0	(+)	med.	2%	(+)	(+)	(+)	+		(+)
45	+	(+)	0		med.	3%	(+)	(+)	0	(+)	(+)	+
46	(+)	0	0		med.	4%	(+)	(+)	0	(+)	+	(+)
52	(+)		0		med.	3%	(+)	(+)		(+)	(+)	(+)?
54	(+)	(+)	0		med.	2%	(+)	(+)	0		(+)	(+)
55	0	0	0		med.	<1%	0	(+)	0		+	0
70	(+)		0	(+)	med.	<1%	0	(+)		(+)	(+)	0
71	(+)	0	0	(+)	med.	<1%	(+)	(+)	0	(+)	(+)	0
72	(+)	0	0	+	med.	<1%	(+)	(+)	0		(+)	+
74	0	0	0	0	med.	1%	0	(+)	0	(+)	(+)	0
82	0	0	0	(+)	med.	<1%	(+)				(+)	0
84	(+)	(+)	0	++	med.	2%	+				+	+
88	0	0	0	0	med.	<1%	0					0
89	0	0	0	0	med.	<1%	0					0
90	0	0	0	0	med.	<1%	0					0

## B. Serological and Anatomical Findings in the Rabbits Immunized with Polyvalent Salmonella Vaccine (8—10, 12—15) (Table 2).

### *Serological Findings.*

The globulin concentration in the treated animals is greatly increased, up to 7.85 %. The serum protein concentration increases at the same time, up to 10.13 %. As in Exp. A, the antibody protein concentration follows the globulin concentration. The average of globulin concentration minus antibody concentration is 1.07 and the globulin concentration in the controls is on an average 0.95 %. Here, too, the antibody formation is thus an entirely extra production of globulin. The serum albumin concentration is somewhat lowered in the treated animals.

### *Anatomical Findings.*

In all 7 treated animals the splenic weight is greatly increased (from about 2 to 7 times the average weight in the normal animals), and there is a fine correlation between the size of the splenic weight and the amount of antibody or globulin.

There is no definite difference in the weight of the liver in the treated animals and in the controls.

The lungs present the same features as observed in Exp. A.

All the treated animals — with exception of one (15) — present an extraordinarily massive plasma cell infiltration in the organs. No. 15 shows merely a moderate plasma cell infiltration in the organs in spite of a rather considerable hyperglobulinemia due to antibody protein. Otherwise there is good agreement between the plasma cell infiltration and the antibody concentration in these animals.

## C. Serological and Anatomical Findings in the Rabbits Immunized with Foreign Proteins (No. 29—33, 36—39) (Table 2).

### *Serological Findings.*

Only in two of these animals (Nos. 30 and 37) was the

globulin concentration increased distinctly. The serum albumin concentration has to be characterized as normal. A calculation shows that the increase in globulin in Nos. 30 and 37 cannot be due to the protein injected. These two animals received respectively 24.3 and 51.1 cg. of globulin in the injections. Setting the serum volume of the rabbits at about 100 cc., and supposing that all the subsequent injected globulin accumulates (what is probably not the case), it is easy to calculate that the highest conceivable globulin concentration that may be elicited by the foreign globulin is respectively 0.24% and 0.51 %. As seen in Table 1, these concentrations are lower than the rise in globulin in Nos. 30 and 37. So probably this rise is produced only in part by the injected protein; presumably the main part is due to formation of antibody protein.

#### *Anatomical Findings.*

The splenic weight is moderately increased in the immunized animals, most in the animals showing the strongest hyperglobulinemia (Nos. 30 and 37).

Microscopic examination of the organs shows a distinct plasma cell proliferation only in the two animals with pronounced hyperglobulinemia and considerable enlargement of the spleen (Nos. 30 and 37). Two other animals (Nos. 31 and 36) — respectively without and with hyperglobulinemia — show a moderate plasma cell proliferation, whereas one animal with slight hyperglobulinemia (No. 38) presents no definite increase in plasma cells in the organs.

#### D. 1a) Serological and Anatomical Findings in Rabbits Immunized with One Pneumococcus Type (Nos. 40, 41, 43) (Table 2).

##### *Serological Findings.*

The serum globulin concentration is moderately increased and the antibody concentration corresponds fairly well to this increase.



### *Anatomical Findings.*

The splenic weight is increased distinctly.

*Histologically* only one animal (41) shows an unquestionable, though rather moderate, increase in plasma cells in the organs — in spite of the hyperglobulinemia and rather abundant amounts of antibody. Two of these animals (Nos. 40 and 41) show rather large amounts of giant-cells of the aforementioned type in the liver.

### D 1b) Serological and Anatomical Findings in Rabbits Immunized with Pfeiffer Bacilli (Nos. 2032 and 2034) (Table 2).

#### *Serological Findings.*

The serum globulin concentrations, determined after Howe's method, showed normal values. The agglutinin titers were respectively 1280 and 320.

#### *Anatomical Findings.*

The splenic weight was not recorded.

In one animal (2034) there was a moderate increase in plasma cells, while the other showed no such increase.

### D 2. Serological and Anatomical Findings in Splenectomized Rabbits Immunized with Polyvalent Pneumococcus Vaccine (Nos. 45, 46, 52 and 54) (Table 2).

#### *Serological Findings.*

The serum globulin concentrations are distinctly increased, differing in no particular degree from the concentrations observed in non-splenectomized rabbits immunized for the same length of time (two rabbits of the latter category showed a globulin concentration of 2.19 % and 4.93 % respectively).

#### *Histological Findings.*

Distinct plasma cell proliferation was seen in one animal

(No. 45 — the one with the highest globulin concentration —). a moderate increase in plasma cells in one animal (54), and doubtful plasma cell proliferation in the remaining two splenectomized animals (Nos. 46 and 52). All the treated animals showed a relatively great increase in plasma cells in the bone marrow, but otherwise no strikingly pronounced plasma cell proliferation anywhere.

### D 3. Histological Examination of Skin Treated with a) Polyvalent Pneumococcus Vaccine and b) with Cowpox Virus (Liver and Calf Virus, 678 L and 678 C).

a) Biopsy on the epidermis and corium shows on the 3' day a moderate diffuse infiltration with polynuclear leucocytes and several lymphocytes and plasma cells; distinct histiocytic proliferation round the blood vessels, where several leucocytes, round-cells and plasma cells are seen, too; small hemorrhages here and there, and slight oedema. All told, there is only a moderate number of plasma cells.

On the 5' day the features are quite the same as on the 3' day, with distinct perivascular granulomas and a little more oedema.

9' day: About the same as on the 3' day, but fewer leucocytes and more plasma cells; several lymphocytes.

13' day: A suggestion of changes as observed on the first biopsy. A moderate diffuse and perivascular plasma cell infiltration is the predominant change. (Photo No. 10.)

19' day: A few granulomas surrounded by rather large amounts of plasma cells and a few leucocytes; distinct but rather slight perivascular cell infiltrations.

All the controlled biopsies show the presence of scanty amounts of plasma cells, diffusely and perivascularly, but not more plasma cells than encountered normally; some lymphocytes are seen here and there together with the plasma cells; scattered small hemorrhages; a few leucocytes here and there.

b) The biopsy material consists of epidermis, corium and platysma. The corium shows interstitial and, in particular, perivascular streaks of histiocytes, lymphocytes and, especially, plasma cells. Several granuloma-like structures are seen in the corium, with many plasma cells in the periphery. Diffuse, moderate plasma

cell infiltration beneath the platysma, in loose connective tissue.

The plasma cell infiltration in the corium is a little more pronounced in biopsy 678C than in 678L. Otherwise the two biopsies present quite the same picture.

### *Guinea-pigs.*

The guinea-pigs treated with polyvalent pneumococcus vaccine showed a very slight plasma cell infiltration in the organs, but, as mentioned, no antibody formation could be demonstrated — nor any increase in the serum globulin concentration.

## **D 4. Serological and Anatomical Findings in India ink-treated Rabbits (2038—2040) (Table 2).**

### *Serological Findings.*

Serum proteins normal.

### *Anatomical Findings.*

Enlargement of the *spleen*. No plasma cell infiltration in any organ. Large amounts of particles of India ink in reticulum cells and macrophages in all the organs examined, most pronounced in the spleen, then (decreasing with the sequence in which the organs are mentioned) in the liver, bone marrow, lungs, suprarenals, and kidneys (here their presence is more pronounced in the sinus fat than in the parenchyma).

## **D 5. Serological and Anatomical Findings in Rabbits with Passive Hyperglobulinemia (Nos. 70, 71, 72 and 74) (Table 2).**

### *Serological Findings.*

Distinct hyperglobulinemia in the animals Nos. 70, 71 and 72, but normal globulin value in No. 74, which was not examined until 10 days after the last injection of globulin.

*Anatomical Findings.*

Splenic weight rather high in the three first animals. No plasma cell reaction in any of them — except in No. 72, in which autopsy revealed extensive pneumonic processes in one lung.

*Recapitulation of the Serological and Anatomical Findings.*

Intensive immunization of rabbits with polyvalent pneumococcus and Salmonella vaccines gives rise to a very considerable antibody formation manifest in a pronounced hyperglobulinemia which in certain cases gives marked hyperproteinemia. In the animals reacting with a very considerable antibody production there is a marked enlargement of the spleen associated with a very pronounced plasma cell proliferation in the spleen, liver, lungs, bone marrow and, in some instances, in the suprarenals and kidneys. The enlargement of the spleen and the plasma cell infiltration made their appearance on about the third day of immunization, whereas antibodies could not be demonstrated prior to the 7' day of immunization.

On immunization with foreign serum protein, the animals that showed hyperglobulinemia presented also enlargement of the spleen and plasma cell infiltration in the organs.

Intense immunization with one pneumococcus type results in some antibody formation and some enlargement of the spleen together with a slight hyperglobulinemia, but only a slight plasma cell infiltration in the organs or none at all.

Immunization with Pfeiffer bacilli (1 strain) produces no hyperglobulinemia, nor any distinct plasma cell infiltration in the organs.

In skin treated with pneumococcus vaccine or cowpox virus, considerable amounts of plasma cells make their appearance at the junctures when presumably antibody is present locally in a considerable amount.

Rabbits treated through a considerable length of time with intravenous injection of India ink have no plasma cell proliferation in the organs.

Experimentally produced passive hyperglobulinemia is not associated with any plasma cell proliferation in the organs. Two features have to be mentioned more thoroughly: The increase in splenic weight and the histological changes.

### *Increase in Splenic Weight.*

In all the experiments the splenic weight of the immunized animals was considerably greater than that of the controls. In Exp. A, as mentioned, we found a peculiar relation between the antibody and the splenic weight, as illustrated in Fig. 1, where the splenic weight and antibody are plotted along the axis of ordinates, the immunization period along the axis of abscissas. It will be noticed that the splenic weight

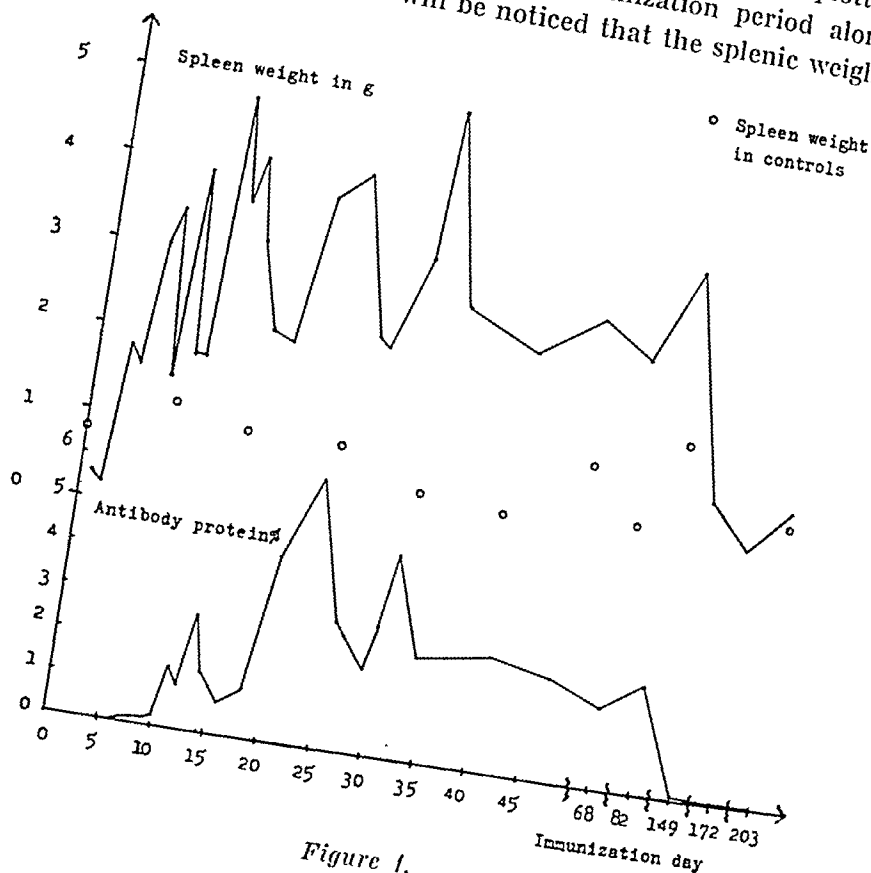


Figure 1.

increases considerably in the first two weeks. After this, it varies greatly and these variations are seen very plainly to follow the variations of the antibody concentration. Here,

- Experiment A
- Experiment B

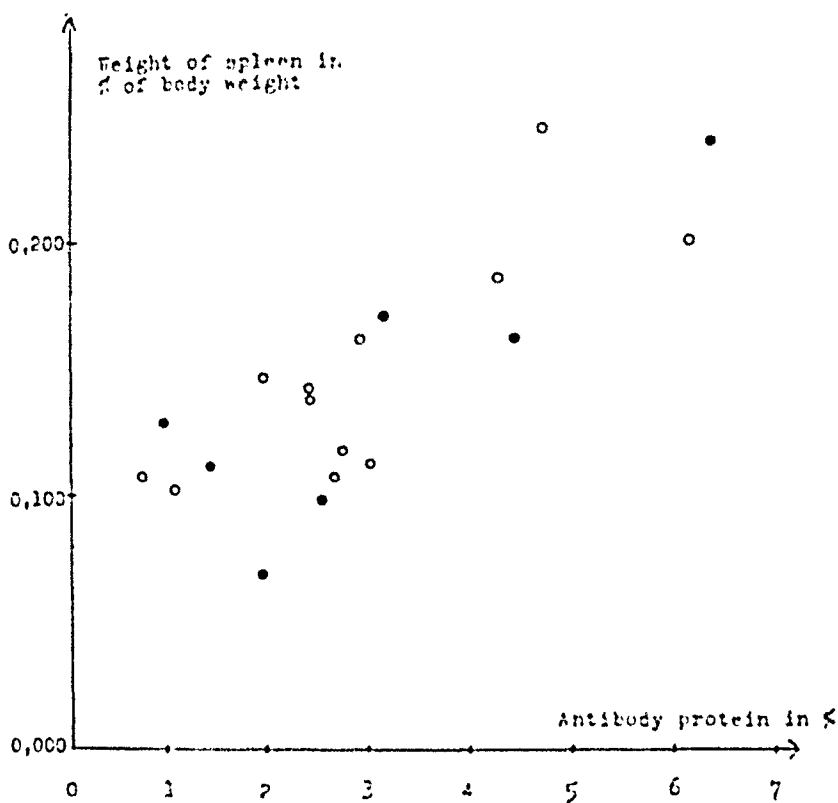


Figure 2.

then, a relation is demonstrated between the size of the spleen and the antibody concentration. Now the objection might be raised, that the splenic weight is subject to great variation and is highly dependent, among other things, upon the amount of the blood in the organism. It is important to emphasize, therefore, that all our animals were bled totally in the same manner, namely, by division of the carotid artery under ether anesthesia.

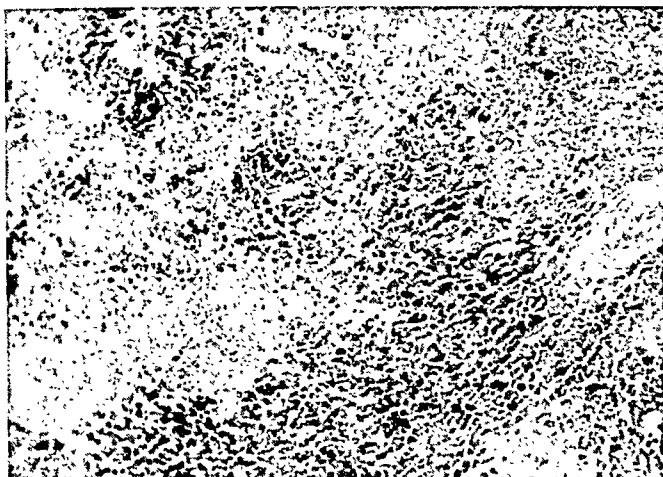
This peculiar finding is now tested out on the entire experimental material. In Fig. 2 the splenic weights recorded in Exp. A (from the 15' to the 48' day) and Exp. B are plotted in relation to the antibody concentration. The splenic weight is recorded in percentage of the body weight of the normal controls autopsied at the corresponding junctures, because our normal rabbits showed a distinct relation between the body weight (age of the animal) and the splenic weight, the latter increasing with the body weight (age). As now the weight (age) of the treated animals differed a good deal in Exp. A and in the other experiments, we have recorded the splenic weight in percentage of the body weight — for the sake of comparability. The splenic weight is calculated in percentage of the body weight recorded for the *normal controls* autopsied at the corresponding junctures, because the body weight of the treated animal was reduced to some (variable) extent during the experiment, chiefly by reduction in the amount of adipose tissue. In Exp. A the treated animals from the 1' to the 15' experimental day are omitted here because the spleen evidently at this point of time undergoes a marked development (formation of the antibody-producing cells?). Also the treated animals from the 68' day of immunization and later are omitted, because, after this point of time, the controls are only few in number, making the calculation of the splenic weight in percentage of the body weight of the normal controls at the corresponding junctures very inaccurate. From Fig. 2 it is quite evident that all the treated animals show proportionality between the splenic weight and the antibody concentration. This relation is ascertained on immunization with 8 *Salmonella* types as well as 8 *pneumococcus* types.

In Exp. C the antibody concentration of the blood was not measured, and hence the relation between splenic weight and antibody concentration cannot be ascertained in this experiment. If we reckon, however, that the increase in serum globulin demonstrated in this experiment is due chiefly to antibody protein, we here meet with the same relation be-

tween antibody protein and splenic weight as in the other experiments.

### *Histological Features.*

The *spleen* is constantly the organ that shows the greatest change. From the 3' to 5' day of immunization — at the same time as the splenic weight commences to increase —



*Photo No. 1.*

Spleen pulp with intensive plasma cell proliferation. Animal No. 12.  
Unna-Pappenheim.  $\times 160$ .

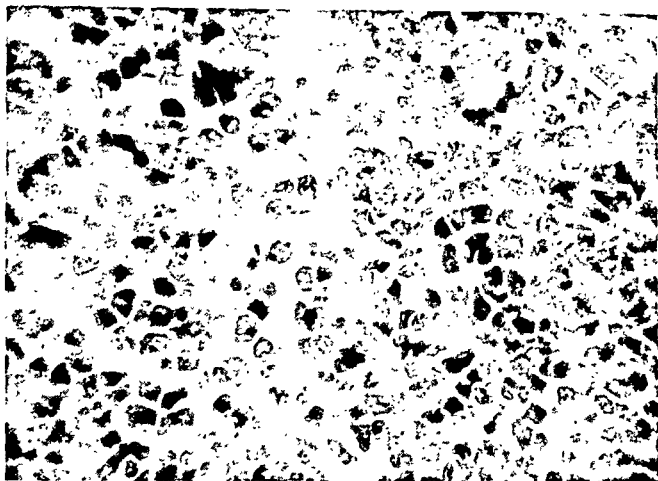
plasma cells begin to make their appearance diffusely in the pulp, and at this juncture there is also a moderate reticulum cell proliferation in the spleen. On the other hand, the plasma cell proliferation appears not to be preceded by any definite reticulum proliferation; nor is there any definite proliferation of the reticulum in the highly immunized animals once the plasma cell infiltration has become massive.

At first the plasma cells are scattered diffusely in the pulp, very often pericapillary in streaks.

When the plasma cell proliferation has become massive, the pulp is dense, extremely rich in cells — almost exclusively



plasma cells, at any rate in large areas, interspersed with a few reticulum cells (Photos 1 and 2). Many blood vessels — for instance, the trabecular arteries — are surrounded by dense coats of plasma cells. At this point of time, the follicles are usually small and few in number, and almost invariably surrounded by dense zones of plasma cells. At no point of time do the treated animals show any pronounced



*Photo No. 2.*

Spleen pulp with plasma cell proliferation. Animal No. 12.  
Unna-Pappenheim.  $\times 470$ .

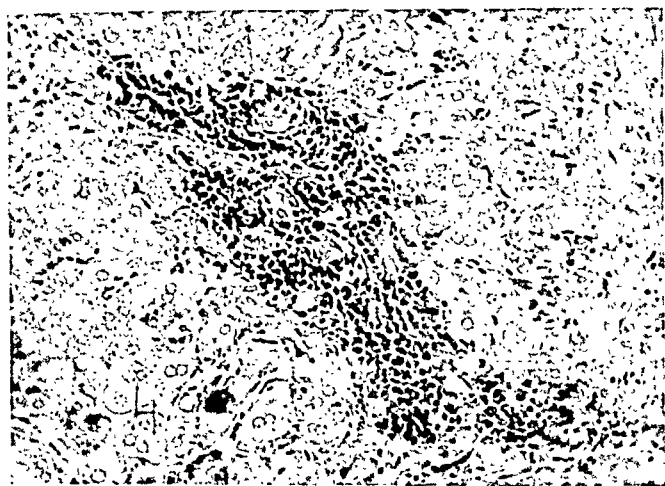
hyperplasia of the follicles or any distinct proliferation of reaction centers.

This quite one-sided proliferation of plasma cells and the juncture for its onset suggests very strongly that the enlargement of the spleen is due to the increase in plasma cells. The same is suggested by the fact that the intensity of the plasma cell proliferation corresponds very well to the degree of the enlargement of the spleen.

In no instance was amyloidosis seen in the spleen, nor in any of the other organs.

Next to the spleen, the *liver* is the organ that showed the greatest changes. Simultaneously with the commencement

of plasma cell proliferation in the spleen, about the 3'—5' day of immunization, plasma cells begin to make their appearance in the liver capillaries and portal spaces. In the beginning of the immunizing process most of the animals show a fairly lively diffuse plasma cell proliferation everywhere in the liver capillaries, while the plasma cells are less numerous in the portal spaces. After immunization for a con-



*Photo No. 3.*

Liver with intensive plasma cell proliferation in a porto-biliary space and in the capillaries. Animal No. 12. Unna-Pappenheim.

× 160.

siderable length of time, on the other hand, the plasma cell infiltration in the capillaries is exceedingly scanty, while these changes are massive in the portal spaces. In a few animals, however, plasma cell infiltration is seen in the liver capillaries as well as in the portal spaces at a late stage of the immunization (Photo 3).

This cellular proliferation appears to be limited entirely to *plasma cells alone*, a few lymphocytes occurring among the plasma cells but extremely seldom.

No distinct proliferation of Kupffer cells could be de-

monstrated in any of the animals with the ordinary staining methods.

There is good agreement between the degree of plasma cell proliferation in the liver and the antibody concentration presented by the animals. On the other hand, it appears not to be a constant phenomenon that plasma cell infiltration is present *both* in the portal spaces and in the capillaries late

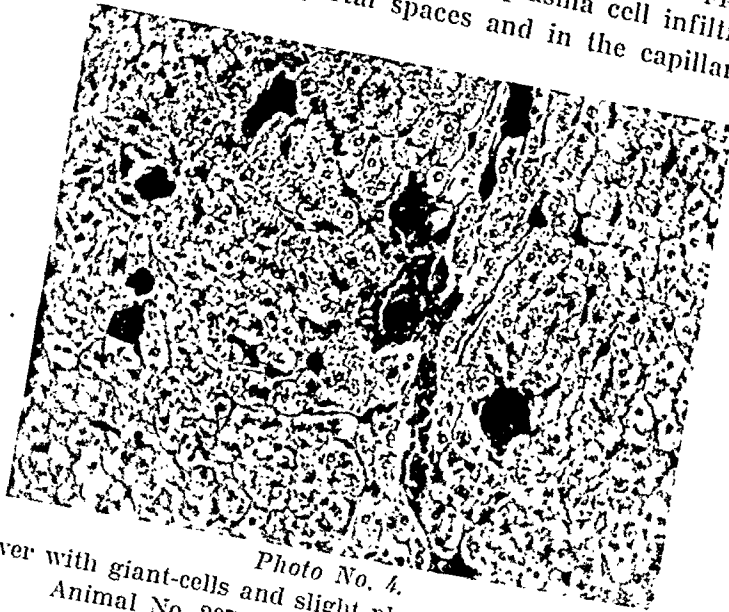


Photo No. 4.  
Liver with giant-cells and slight plasma cell proliferation.  
Animal No. 2074. Unna-Pappenheim.  $\times 160$ .

in the process of immunization in the animals with the highest antibody concentration.

A striking feature is the rather considerable amount of giant-cells seen in several of the highly immunized animals. These giant-cells are large, multinuclear and rich in protoplasm, with the nuclei scattered diffusely, not particularly marginate (Photo 4). The giant-cells are located intracapillary, especially in the periphery of the lobules. Sometimes they are surrounded by a narrow zone of plasma cells. Presumably they are foreign body giant-cells originating from the capillary endothelium (or the Kupffer cells?) under the protracted influence of the massive bacterial doses.

In one normal animal a few similar giant-cells were seen in the liver, but no such cells were observed in the animals immunized with foreign protein or in animals immunized only for a short time.

No animal shows any abnormality of the liver parenchyma.

The third of the examined organs belonging to the reticulo-endothelial system, the *bone marrow*, shows on the whole only rather slight changes.

During the process of immunization there is a moderate diffuse increase in plasma cells in the parenchyma of the marrow — a plasma cell proliferation which here, in contrast to the other organs examined, can be estimated quantitatively by counting. The plasma cell proliferation, which at the most leads to an amount of plasma cells equal to 7 % of all the nucleated cells of the marrow, follows closely the degree of plasma cell proliferation in the other organs — and shows good agreement with the globulin and antibody concentration.

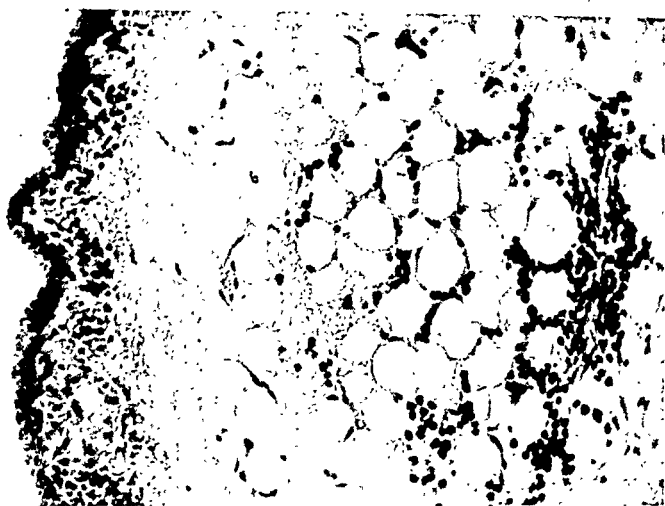
As always in reactive plasma cell proliferations in the bone marrow, the plasma cells are both scattered diffusely throughout the marrow and accumulated into small islands of 5—6 cells, besides forming distinct pericapillary envelopes.

No distinct proliferation of reticulum cells could be demonstrated in any section from the bone marrow of any animal, and the evident hyperplasia of the bone marrow observed in several of the highly immunized animals appears not to be explainable as brought about by proliferation of reticulum cells or of plasma cells. It seems more likely that all the components of the marrow increase in number (splenogenous inhibition of the marrow from the enlarged spleen?).

Like in the bone marrow, in the *suprarenals* — the fourth organs belonging to the reticulo-endothelial system — the changes are only moderate. The plasma cell proliferation was not massive in any case though rather considerable in many. This phenomenon is most pronounced in the capillaries on the border between the cortex and the medulla and in the capillaries of the medulla. In several cases, however, the

plasma cell proliferation is quite diffuse in all the capillaries, and a rather considerable intravascular accumulation of plasma cells immediately beneath the capsule is a frequent finding. Besides, plasma cell infiltration in the adipose tissue surrounding the suprarenals is seen in several cases.

In the *kidneys* the plasma cell reaction is more pronounced than in the suprarenals, the infiltrations being interstitial,



*Photo No. 5.*

Renal pelvis mucosa and fat tissue of renal sinus with diffuse plasma cell proliferation, especially around a capillary. Animal No. 12. Unna-Pappenheim.  $\times 160$ .

perivascular, especially in the cortex, and sometimes periglomerular. In no instance does the kidney parenchyma proper present any abnormality.

In most cases the adipose tissue in the renal sinus, round the pelvis, shows a considerably stronger plasma cell reaction. Plasma cell infiltration here is a constant finding in all the highly immunized animals; and proliferation of plasma cells alone is encountered here, especially round the blood vessels (Photos 5 and 6).

In the *lungs* the changes are essentially more pronounced than in the two last-mentioned organ systems.

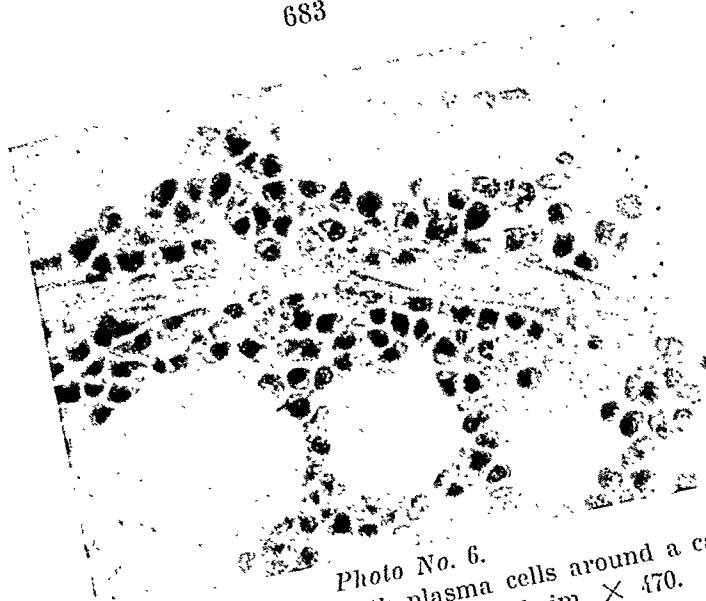


Photo No. 6.

Fat tissue in renal sinus with plasma cells around a capillary.  
Animal No. 12. Unna-Pappenheim.  $\times 470$ .

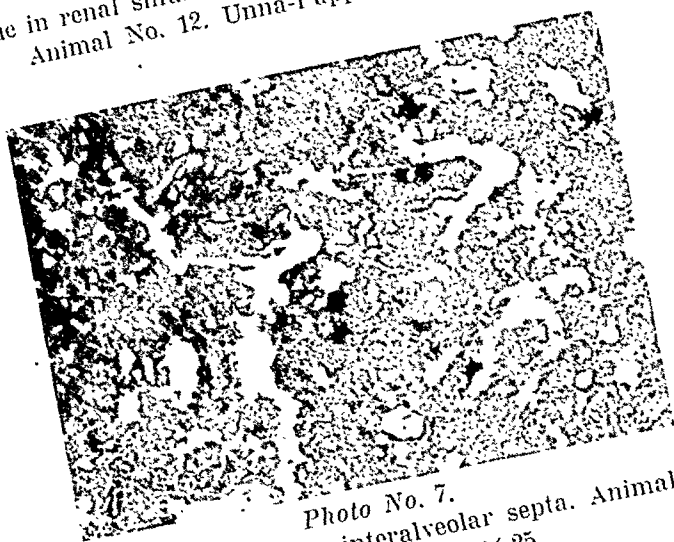


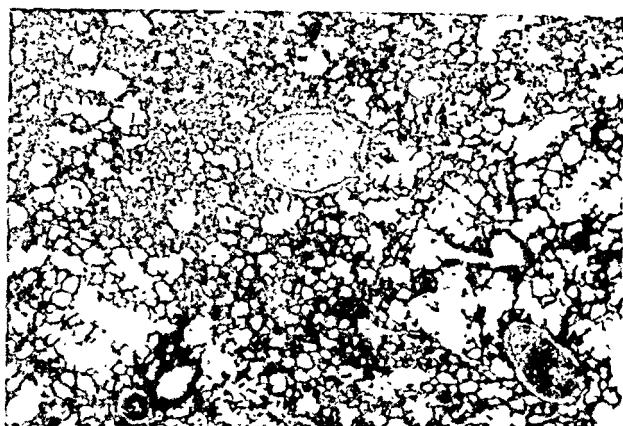
Photo No. 7.

Lung with thickening of the interalveolar septa. Animal No. 2076.  
Unna-Pappenheim.  $\times 25$ .

In the first place, as mentioned, there is a distinct macroscopic increase in the size and consistence of the lung, the tissue becoming more or less fleshy. Correspondingly, sections from the lungs show a rather considerable thickening of the interalveolar septa (Photos 7 and 8) — a constant phenomenon

in the moderately and highly immunized animals though subject to individual variation, but apparently equally developed throughout the individual lung. This thickening is due to an endothelial and histiocytic proliferation that is pronounced in the early stages, while in the later stages there is in addition a more or less distinct fibrosis.

Secondly, during the process of immunization the lungs



*Photo No. 8.*

Lung from normal rabbit, Unna-Pappenheim.  $\times 25$ .

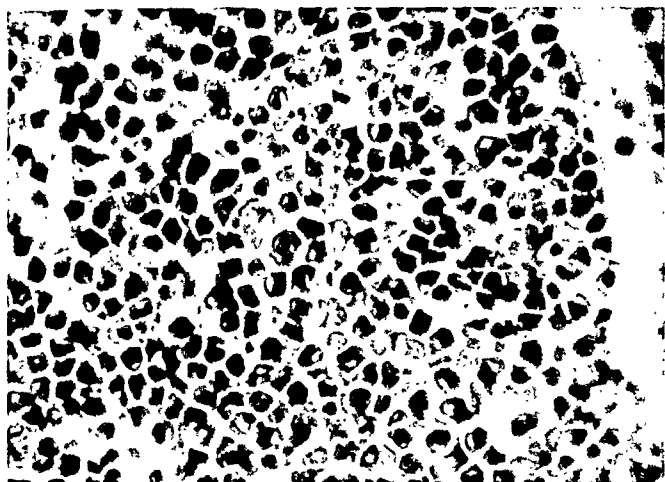
are the site of rather considerable plasma cell infiltrations, in particular round the smaller and medium-sized blood vessels, and to some extent round the bronchi too, besides pericapillary in the alveolar septa, diffuse or arranged in delicate streaks — but never in any great amounts here in the septa.

It is to be noted that the lymphatic infiltrations in the walls of the bronchi remain unchanged, without showing any plasma cell proliferation. At the most, there now and then appears a quite scanty plasma cell proliferation in the periphery of the lymphatic infiltration, apparently originating from cells of the surrounding tissue rather than from elements of the lymphatic infiltration.

The more or less organized thrombi in the blood vessels of the lungs of which we observed a considerable number in the rabbits mentioned in our previous paper, immunized

through a very long period, were seen only in a very few cases in the experiments reported here.

As mentioned already, the *lymph nodes* show a greatly variable amount of plasma cells in the normal animals. Yet it looks as if the lymph glands in the highly immunized animals (Nos. 8—15) participate distinctly in the almost



*Photo No. 9.*

Medullary cord of lymph node with intensive plasma cell proliferation. Animal No. 12. Unna-Pappenheim.  $\times 170$ .

universal reaction with plasma cell proliferation (Photo 9).

On the other hand, the *thymus*, which normally appears to be almost free from plasma cells, evidently does not take part in the plasma cell proliferation of the organism. Nor is there any plasma cell increase in the *skin* during the process of immunization.

*Bacteria* could not be demonstrated in the organs at any points of time.

Unfortunately the plasma cell aspects of the *intestinal mucosa* were not examined in the largest of the experimental series. In the other experiments there is no definite correlation between the amount of plasma cells in the intestinal mucosa and in the other organs.



No plasma cell proliferation was observed in the *meninges* in any examined animal.

*Blood smears* were made from all the rabbits examined, immediately before the animal was killed. No differential count was made because in these experiments we were particularly interested in the question whether plasma cells occurred in the blood.

In the controls the blood shows almost constantly a few plasma cells of the so-called Türk type, as a rule less than 1 %.

In most of the treated animals the amount of blood plasma cells is just as slight as in the normal animals, but several of the highly immunized animals show a slight increase in Türk cells in the blood (at the most, 2—3 %), whereas quite typical plasma cells of the type observed in the tissues have not been seen in the blood of any animals.

As is well known, it is a disputed question whether Türk cells are to be looked upon as a particular »Reizungsform« of lymphocytes occurring in the blood, especially in infectious conditions, or whether they are to be regarded as being in a line with the other plasma cells of the organism (a review of this question has been given by Gormsen<sup>6</sup>). The only established fact concerning Türk cells appears to be that they are formed in lymphatic tissue and that they differ morphologically from the plasma cells of the bone marrow and inflammatory processes in having a considerably larger nucleus.

It cannot be decided whether the slight increase in Türk cells observed in the blood of several of the highly immunized animals is to be looked upon as an »irritative« phenomenon analogous to the appearance of Türk cells in infectious diseases, or whether it is to be interpreted as signifying that the almost universal plasma cell proliferation that occurs in the immunized animals brings about a proliferation of this cell type in the blood.

But, even if we assumed that the Türk cells and the plasma cells of the bone marrow would constitute a cytological unity, in that the Türk cells originated from the bone

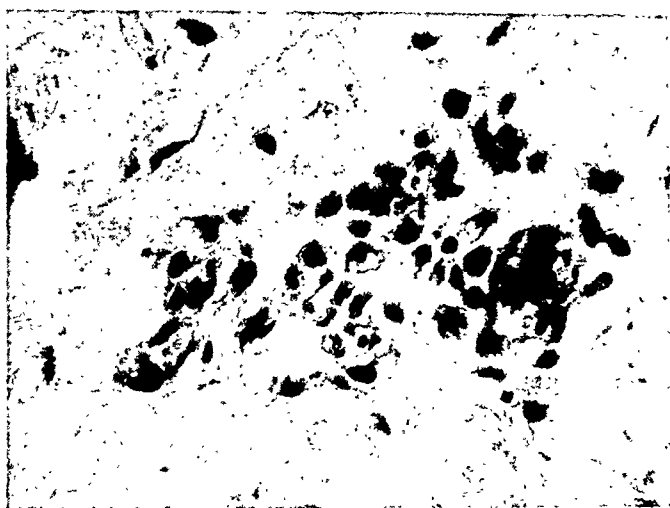
marrow — which seems rather unlikely for several reasons (Gormsen<sup>9</sup>) — the slight and inconstant increase in the number of plasma cells in the blood, together with the fact that only a rather slight increase has been demonstrated in the number of plasma cells in the bone marrow, would go against the idea that the organs receive their massive amounts of plasma cells from the bone marrow by way of the blood stream even though such a possibility cannot be excluded entirely on the basis of the present studies.

Our findings rather support the view of an autochthonous origin of the plasma cells in the various organs.

As to the *morphology of the plasma cells* in the infiltrations described in the various organs, most of the cells have to be characterized as quite typical plasma cells with an eccentric »wheel nucleus« with a light halo in the abundant, slightly spongiöse protoplasm, which stains intensely red with the Unna-Pappenheim method. Still, many of the plasma cells, especially in the spleen and bone marrow, have to be characterized as young forms with a rather scanty protoplasm and without the characteristic »spoke« arrangement of the chromatin in the nucleus, or with merely a suggestion of this feature. Many of these cells correspond to the concept of »plasmacellular reticulum cells« (Rohr<sup>30</sup>) which are taken to be progenitous of plasma cells — transitory stages between the reticulum cell or the non-differentiated mesenchyma cell and the mature typical plasma cell. Others remind a great deal of the cells which Rich, Lewis & Wintrobe<sup>20</sup> designate as »acute splenic tumor cells«.

No positive evidence for a decisive conclusion as to the *genesis of plasma cells* is afforded by our experimentally produced, elective, very extensive plasma cell proliferations, it is true, but, we think, the blood examinations go *against* the view of a hematogenous distribution of the plasma cells and *in favor* of an autochthonous proliferation. The observation that the lymphatic infiltrations in the lungs and the follicles in the spleen do not become the site of plasma cell proliferation goes *against* a lymphocytic genesis of the plasma

cells; and the finding of many forms which correspond closely to the so-called »plasmacellular reticulum cells« speaks *in favor of* a genesis of the plasma cells from reticulum cells. Finally, a genesis from undifferentiated mesenchymal cells (histiocytes) is suggested, among other things, by the fact that massive plasma cell proliferation may arise in the reticu-



*Photo No. 10.*

Corium with perivascularly arranged plasma cells and histiocytes.  
Experiment D3. 13' day. Unna Pappenheim.  $\times 435$ .

lum cell-free adipose tissue of the renal sinus — provided that the hypothesis about an autochthonous origin of the plasma cells be tenable.

### *Discussion.*

On the whole, our experiments have shown that there is a constant relation between antibody formation and plasma cell proliferation.

This fact may conceivably be explained in three ways, namely:

1) The antibody production and the plasma cell proliferation are parallel phenomena, both being brought about by the immunization.

2) Plasma cells play an important rôle in the antibody formation.

3) The antibodies in the blood elicit a secondary plasma cell proliferation in the organs.

The last possibility, we think, has been excluded by Exp. D 5, in which we produced a passive hyperglobulinemia in rabbits without the appearance of any increase in the amount of plasma cells in the organism.

Thus, the two first possibilities remain.

As to the first-mentioned, we think we have excluded the special possibility that the plasma cell proliferation might simply result from a »foreign body action« of the bacteria. Furthermore, in Exp. C, the employment of dissolved protein antigen resulted in a distinct plasma cell proliferation in the organism, and here the possibility of a »foreign body action« is out of the question. As now it seems reasonable to assign the antibody formation to the reticulo-endothelial system, and as the most conspicuous change in this system under the intensive antibody production we elicited is the plasma cell proliferation, we find it most likely that plasma cells alone produce the antibody, or that plasma cells represent functional stages of the antibody-producing cells.

In this connection it is to be mentioned that our experiments have demonstrated a »directly proportional« relation between antibody concentration and the degree of plasma cell proliferation in the organism.

The relation between hyperglobulinemia and plasma cell proliferation and the hypothesis about the possible rôle of plasma cells as globulin producers has been mentioned before by several authors — first by Bing & Plum<sup>3</sup>, later by Markoff<sup>23</sup>, Jersild<sup>18</sup>, Wuhrmann & Leuthardt<sup>34</sup>, Rohr<sup>31</sup>, Undritz<sup>33</sup>, Gsell<sup>11</sup>, Ejnar Nielsen<sup>26</sup>, Petri, Nørgaard & Bing<sup>27</sup>, Gormsen & Heintzelmann<sup>10</sup>, Habelmann<sup>12</sup>, and Fleischhacker<sup>8</sup>. On the other hand, the hypothesis about the rôle of plasma cells as antibody producers appears to have been advanced only in one previous work by Kolouch<sup>22</sup> — on the basis of experi-

mental observations — and he merely touches on this possibility.

When the observation of the relation between antibody production and plasma cell proliferation appears not to have been pointed out before — neither in immunizing experiments nor in pathologic-anatomical studies — it is presumably because the antibody concentrations have not reached the magnitudes produced in our animals. Further, as a rule, a pathologist usually meets with changes brought about merely by one previous immunizing experiment with only one bacterial type bacterial antigen, and from our experiments it is evident that even very intensive immunization with several bacterial types elicited merely a rather modest plasma cell proliferation in the organs of the treated animals.

In our experiments an intensive immunization with several bacterial types simultaneously has resulted in the »overexposed« picture of the plasma cell proliferation which in all probability forms the foundation for the antibody production.\*)

The result of our studies affords the experimental foundation for the hypothesis advanced previously: that the hyperglobulinemia observed in man, too, at any rate in infectious diseases and presumably also in other morbid conditions as serum sickness and agranulocytosis, is due to antibody formation.

The results obtained with these experiments invite investigation of the globulin concentration in patients with enlargement of the spleen in infectious diseases.

Enlargement of the spleen during the process of immunization has been observed previously (e. g., Rich<sup>28</sup>, Rich, Lewis & Wintrobe<sup>29</sup>, Kallos<sup>19</sup>, Hellmann & White<sup>13</sup>). The almost constant relation between the antibody concentration and the

\*) This modification of the hypothesis of Bing & Plum — that it is only the *antibody globulin* that is formed in plasma cells and not *normal globulin* — explains easily the fact that embryos and infants lack plasma cells though their serum globulin concentration is normal.

splenic weight we have observed appears to indicate that the spleen plays a great rôle in the antibody production. That the spleen is not the only antibody-producing organ, however, is evident from the circumstance that many other investigators have likewise found that splenectomized animals are quite capable of antibody formation.

The most reasonable explanation of this phenomenon, we think, has to be looked for in the fact that the plasma cell proliferation essentially originates from elements of the reticulo-endothelial system, and as this system constitutes quite a considerable part of the spleen, the splenic weight is naturally increased by the proliferation in the reticulo-endothelial system.

In other organs—for instance, the liver, the relative weight of the reticulo-endothelial system is too slight to influence noticeably the weight of the organ during the process of immunization.

### *Conclusions*

Intensive immunization of rabbits with polyvalent vaccine results in a massive plasma cell proliferation in practically all organs, especially in the spleen and liver, and the degree of this plasma cell proliferation corresponds closely to the antibody concentration.

In all probability antibodies are formed by plasma cells, and the present studies appear to prove conclusively that the increase in splenic weight that occurs under intensive immunization is due to the plasma cell proliferation in the spleen.

### REFERENCES

1. Azzu, A. Zscher, *J. Immunitätsforschung, exper. Therap.* 99, 67, 1949.
2. Böhm, R. Immunisierung, in Kolle, Krause & Uhlenhuth, *Höb. d. pathogenen Mikroorganismen* II, 1, 149, 1929.

3. Bing, J. & Plum, P.: Acta med. Scandinav. 92: 415, 1937.
4. Bjorneboe, M.: Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap. 99: 245, 1941.
5. — Acta path. et microbiol. Scandinav. (in press).
6. — & Gormsen, H.: Nord. Med. 9: 891, 1941.
7. — Klin. Wchnschr. 20: 314, 1941.
8. Fleischhacker, H.: Deutsches Arch. f. klin. Med.: 186, 506, 1940.
9. Gormsen, H.: Knoglemarvsundersogelser. (With an English summary). Dissertation. Copenhagen 1942.
10. — & Heintzelmann, F.: Nord. Med. 11: 2125, 1941.
11. Gsell, O.: Klin. Wchnschr. 18: 778, 1939.
12. Habelmann, G.: Klin. Wchnschr. 19: 1211, 1940.
13. Hellmann, T. & White, G.: Virchows Arch. 278: 221, 1930.
14. Henriques, V. & Klausen, U.: Biochem. Ztschr. 254: 414, 1934.
15. Huebschmann, P.: Verh. d. deutsch. path. Ges. 16: 110, 1913.
16. Jaffé, R. H.: The Reticulo-endothelial System. Hal Downey: Hdb. of Hematology. 2: 1118, 1938.
17. Jancso, N.: Klin. Wchnschr. 10: 537, 1931.
18. Jersild, M.: Acta dermat.-venereol. 18: 491, 1937.
19. Kallós, P.: Beiträge zur Immunbiologie der Tuberkulose. Monographie aus dem »Wennergren Institut für experimentelle Biologie« der Universität Stockholm 1941.
20. Kauffmann, F., Bjorneboe, M. & Vammen, B.: Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskr. 121: 36, 1938.
21. Klein, E.: Ztschr. f. d. ges. Neurol. u. Psychiat. 21: 242, 1914.
22. Kolouch, Fr. Jun.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 39: 147, 1938.
23. Markoff, N.: Deutsches Arch. f. klin. Med. 180: 530, 1937.
24. Mas y Magro, F.: Arch. f. exper. Zellforsch. 8: 415, 1929.
25. Miller, F. R.: J. Exper. Med. 54: 333, 1931.
26. Nielsen, E.: Nord. Med. 5, 457, 1940.
27. Petri, S., Norgaard, F. & Bing, J.: Nord. med. Tidskr. 14: 130, 1937.
28. Rich, A. R.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 32: 1349, 1935.
29. —, Lewis, M. R. & Wintrobe, M. M.: Bull. Johns Hopkins Hosp. 65: 331, 1939.
30. Rohr, K.: Folia hemat. 35: 305, 1936.
31. — Helvet. med. acta. 5: 554, 1938.
32. Sabin, F.: J. Exper. Med. 70: 67, 1939.
33. Undritz, E.: Helvet. med. acta. 5: 548, 1938.
34. Wuhrmann, F. & Leuthardt, F.: Klin. Wchnschr. 17: 409, 1938.
35. Ørskov, J. & Kragh Andersen, E.: Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap. 92: 487, 1938.

## ACUTE FATAL HYPERPARATHYROIDISM.

By Jan Mellgren.

(Received for publication october 7th, 1942).

Hyperparathyroidism is a pathological condition which has become the object of increasing study during the last decades.<sup>1)</sup>

The central feature of the disease is an excessive production of parathormone. The patho-anatomical phenomenon as a rule corresponding to the increased parathyroid function consists in an enlargement of one or more parathyroids. According to *Castleman and Mallory* (1937) the parathyroid enlargement can be divided into three different types: 1. *Primary hyperplasia* of all glands, histologically dominated by water clear cells and with a clinical course characterized by a tendency to rapid relapse if only one or two of the hyperplastic glands are removed. 2. *Primary adenoma* (rarely multiple ones in several parathyroids), histologically of varying structure, as a rule benign and dominated by hypertrophic chief cells. In these cases the non-adenomatous glands

---

<sup>1)</sup> For details the reader is referred to the following works. Experimental: *Collip* 1925: 1 and 2, 1926: 1 and 2, 1927; *Hueper* 1927; *Jaffé, Bodansky and Blair* 1930; *Bodansky and Jaffé* 1931; *Olsen* 1931. Patho-anatomical: *Askanazy* 1904; *Bergstrand* 1921, 1931, 1938; *Herrheimer* 1926; *Castleman and Mallory* 1935, 1937; *Halshofer* 1937; *Schellack* 1939. Clinical: *Mandl* 1926; *Albright et al.* 1934: 1 and 2; *Churchill and Cope* 1934; *Gutman et al.* 1934; *Hellström* 1935.



have been considered normal. 3. *Secondary hyperplasia* of all parathyroid glands as a result of chronic renal insufficiency. Histologically, this type is said to be characterized mainly by normal-sized chief cells.

This classification seems to be satisfactory in a number of cases and as a working hypothesis it has proved valuable to the surgeon because of its practical consequences, especially differentiating type 1. It has also been accepted by several pathologists (*Boyd* (1940) and others), but it has certain shortcomings which will be discussed below in connection with the case here reported.

The parathyroid hyperfunction causes a disturbance in the mineral metabolism. In the so-called primary cases according to *Castleman* and *Mallory's* classification, the latter as a rule reveals itself in an increased calcium content and a decreased phosphorus content in the serum together with increased excretion of calcium and phosphorus in the urine. In secondary hyperparathyroidism resulting from chronic renal insufficiency, on the other hand, we find increased serum phosphorus and normal, or decreased, serum calcium. It has been assumed on good grounds that the increase of the serum phosphorus in these cases is a direct consequence of the renal insufficiency and that the elevated serum phosphate level leads in its turn to the depression of the serum calcium and also to the reactive parathyroid hyperfunction (*Castleman* and *Mallory* (1937); *Drake, Albright* and *Castleman* (1937) and others). Whatever the genesis of the hyperfunction («primary» or «secondary») the calcium balance is negative, at least over certain periods. The skeleton is thus deprived of calcium salts, and in advanced cases the result is generalized osteitis fibrosa with its well-known skeleton pathology and secondary clinical symptoms (bone pains, fractures, deformities, typical X-ray picture). The skeleton affection, however, varies strongly in different cases, from the mildest form of osteoporosis or local giant-cell tumour (*Gutman* et al. 1934, *Hellström* 1935) to grotesque osteitis fibrosa. In some cases the skeleton is intact both clinically and anatomically. *Albright, Baird, Cope* and

*Bloomberg* (1934) rightly assume that the degree of bone changes is the indicator of the duration of the disease rather than of its severity.

The increased calcium excretion very often leads to metastatic calcium deposits in various organs, specially in the kidney parenchyma and the urinary tract (diffuse calcium precipitation in the canal epithelium, basal membranes, glomeruli and interstitially in the kidney; concrement; often secondary pyelonephritis; not infrequently terminal, secondary renal insufficiency).

The ordinary, chronic forms of hyperparathyroidism in particular have been subjected to clinical studies. As a rule they all begin insidiously and go on over very long periods (according to *Halshofer* (1937) as a rule for 4--20 years, 2 years at the shortest); the course of the disease can seldom be measured in months (*Gutman et al.* 1934). It is true that the chronic forms show symptoms which have rightly been thought to be caused directly by the hypercalcaemia. Fatigue, hypotonia and lessened neuromuscular excitability thus belong to the most constant symptoms (*Albright, Aub and Bauer* 1934; *Halshofer* 1937, and others), and anorexia, vomiting, constipation and loss of weight are not unusual (*Morelle* 1934, *Gutman et al.* 1934, *Albright et al.* 1934: 1 and 2, *Halshofer* 1937). Prolonged PQ interval in electrocardiogram may also occur (*Köhler* 1942 and others). The chronic cases, however, are also characterized by the symptom picture's being dominated, at least over certain periods, by secondary skeleton symptoms or by renal symptoms (osteitis fibrosa or osteoporotic form, and nephrolithiasis or renal insufficiency respectively; cf. *Albright et al.* 1934: 1 and 2, *Gutman et al.* 1934, *Halshofer* 1937). The gastrointestinal symptoms only seldom predominate (*Morelle* 1934, *Gutman et al.* 1934, *Halshofer* 1937), possibly as an expression of temporary acute exacerbations.

Acute hyperparathyroidism in animals has been studied experimentally by *Collip* (1925: 1 and 2, 1926: 1 and 2, 1927), *Hueper* (1927) and others. By repeated injections of parat-

hormone into dogs *Collip* provoked a typical lethal poisoning, distinguished by vomiting, diarrhoea and atony. At the same time characteristic blood changes appeared: The calcium level rose continuously to about 20 mg% only to fall somewhat just before death, whereas the serum phosphorus and N. P. N. only terminally rose to high values. A terminal marked increase of the whole concentration of the blood was further very characteristic, being reflected in rising values for hemoglobin, erythrocytes per mm<sup>3</sup>, osmotic pressure and viscosity.

A post-mortem examination of the animals thus poisoned revealed an increased calcium content in certain tissues, especially in the myocardium (up to 50 mg% as compared to normal 4 mg%) and the kidneys (200 and 7 mg% respectively). Microscopically, calcium deposits could be observed in the majority of internal organs, especially in the myocardium, kidneys, gastric mucosa and lungs (*Hueper* 1927). Hyperaemia of the intestinal mucous membrane regularly occurred, and haemorrhagic gastritis was frequent. *Hueper* (1927) further made the remarkable observation of multiple thromboses in various parts of the vascular system, especially in the liver of parathormone poisoned dogs.

Analogous to these animal experiments is a case of experimental hyperparathyroidism in man which has been described by *Lowenburg* and *Ginsburg* 1932. A boy, aged 5 years, was treated for severe purpura. Inter alia he was given daily intramuscular injections of parathyroid extract. By mistake he was given too much extract, thus receiving 100 units of the hormone daily for six days.

Vomiting began on the second day of administration and gradually increased in severity; this was the earliest symptom. On the third day he became listless, and on the fourth day vomiting became pronounced and the general physical depression more severe. On the fifth day, he was extremely lethargic, apathetic and answered very slowly and monosyllabically to questions. The lids drooped, he made practically no spontaneous movements and was almost unable to sit up

in bed by himself. He had a high, irregular fever throughout this period (max. 39.4° C). No knee jerks could be obtained.

Before the treatment, the serum calcium was 10.2 mg% and the bleeding time more than 2 hrs. Visible bleeding stopped after the first day of treatment. On the second day, the bleeding time was 5' 10". On the sixth day, the serum calcium was 19.6 mg% and the serum phosphorus 4.4 mg%. The administration of parathyroid extract was then stopped and the patient was given continuous venoclysis of physiologic solution of sodium chloride. Gradually all symptoms disappeared on the following days, and the serum calcium, the serum phosphorus and the temperature became normal, too. No changes of the long bones could be proved by an X-ray study seven days after the parathyroid extract had been discontinued.

*Lowenburg* and *Ginsburg* rightly point out that the symptomatology noted is but little different from that reported in animals with experimental hyperparathyroidism, with the exception of the high temperature. They also suggest that the hyperpyrexia was due to the increased blood viscosity and diminished blood volume reported by experimental workers in animals, as in ordinary dehydration states.

Spontaneous acute fatal hyperparathyroidism in man, on the other hand, is less known. So far only isolated reports on clear or suspected cases of this type are found (*Dawson* and *Struthers* 1923, *Herxheimer* 1926, *Herzenberg* 1933, *Mellgren* 1936, *Hanes* 1939, *Oliver* 1939, *Arnold* 1940, *Smith* and *Cooke* 1940). *Oliver* 1939 has rightly pointed out that the spontaneous acute hyperparathyroidism may present a special clinical syndrome dominated by gastro-intestinal symptoms and very similar to the one that has been observed in parathormone poisoned dogs. *Oliver's* review of cases (comprising those reported by *Dawson* and *Struthers* and by *Hanes*, and also two cases of his own), however, does not discuss important aspects of the pathology of the acute lethal hyperparathyroidism (cf. *Mellgren* 1936).

## Cases of acute hyperparathyroidism reported in the literature.

### 1. Doubtful cases.

The first case to be included here was reported by *Dawson and Struthers* in 1923. The patient was a man of 49 who had suffered from pains in different parts of the body for more than 5 years, especially in the bones. Repeated pathologic fractures occurred during the last year of life. An X-ray examination revealed a pathological process in the left humerus and the cranial vault. On one occasion the urine contained a faint trace of albumin. Otherwise no morbid symptoms were observed. He was suddenly seized with a heart attack, lay in a state of collapse for 12 hours and died without the cause of the heart attack being established.

The autopsy showed a generalized osteitis fibrosa which was far advanced particularly in the humerus and the skull. A parathyroid tumour was further found, being the size of a walnut, microscopically of papillary structure and composed of chief cells. Four parathyroids of normal or slightly enlarged size were also found; they were considered to be normal in structure. The microscopic examination finally revealed calcium deposits in the form of fine granules, which in some instances became confluent masses, in all the internal organs and tissues of the body, especially in the lamina elastica interna of the arteries, in the myocardium, lungs, stomach and kidneys.

*Albright* and his co-workers (1934: 2) are possibly right in looking upon *Dawson and Struthers'* case as chronic hyperparathyroidism complicated by an acute exacerbation. The observed degree of metastatic calcification thus does not characterize chronic hyperparathyroidism (especially not the calcification in stomach and myocardium; cf. *Halshofer* 1937) but is in accordance with the one that appears in experimental acute parathormone poisoning in animals (cf. *Collip* 1925: 2, *Hueper* 1927). On the other hand, *Dawson and Struthers'* case does not present the picture of intoxication typical in the animals (vomiting, diarrhoea, atony) together with an increase of the calcium and phosphorus level of the blood and an increase of its general concentration (cf. *Collip* 1925 and others above). The calcium deposits thus make an acute lethal hyperparathyroidism probable to a certain extent, but in the absence of any clinical criteria the acute component in this case must be considered to be insufficiently evidenced.

Another pertinent case has been observed by *O. Lubarsch* and described by *Herzheimer* 1926. A man, aged 32, had for some months suffered from lack of appetite, tenderness in the epigastrium, swelling of the liver, headaches and apathy. Finally deliria and ex-

haustion. The postmortem examination revealed mitralisendocarditis with stenosis and general stasis phenomena, icterus, thrombi in the plexus prostaticus and calcium deposits in the majority of internal organs, for instance in the brain and especially in the myocardium and kidneys. The bone system, however, showed no noteworthy changes. Three parathyroids were found, one of them the size of a cherry. Obviously the same reservation should be made in this case as was made in that reported by *Dawson* and *Struthers*; the diagnosis of an acute lethal hyperparathyroidism is not definitely established even though the calcium metastases may point in that direction.

*Herzenberg* observed, in 1933, a case of hyperparathyroidism which has aroused attention by its unusual clinical picture. The patient was a man aged 45 who had been suffering from »dragging« pains in the legs during the last years, and from obstipation for 15 years. For two years he had had dull pains in the epigastrium, eructations and heartburn. A gastric ulcer was diagnosed and the man was put on an ulcer diet, but he only became worse and weaker. One year before death occurred, an X-ray examination showed that the gastric ulcer had become cicatrized. In spite of this he became worse, lost his appetite and vomited after meals. The general weakness increased as did also the abdominal pains, and he lost weight. After admission to hospital hypochylia gastrica was diagnosed (total acidity 8) and occult blood was found in the faeces. His condition rapidly grew worse and after a few days he died from heart failure.

The post-mortem examination revealed jaundice, far advanced generalized osteitis fibrosa (but without cysts or brown tumours), haemorrhagic necrotizing gastritis together with intense precipitation of calcium in the membranae propriae of the gastric mucosa. Calcium metastases were also found in kidneys and liver. Also luetic mesaortitis. Finally a parathyroid adenoma was found, mainly composed of chief cells. The other three parathyroids are said to have been normal.

This case may possibly be interpreted as a chronic hyperparathyroidism complicated by a subacute final phase. Both the distribution of the calcium metastases and the haemorrhagic gastritis point in this direction. The latter resembles the gastric changes observed by *Hueper* (1927) in parathormone poisoned dogs. To this should be added that vomiting and asthenia form the main features in the clinical picture as also in experimental parathormone poisoning (cf. *Lowenburg* and *Ginsburg* above), although the course was more prolonged here. On the other hand the haemorrhagic

gastritis may naturally have a different genesis. The diagnosis is as doubtful as in the cases reported by *Dawson-Struthers* and *Lubarsch-Herzheimer*.

## 2. *Mild acute hyperparathyroidism.*

Of special clinical interest in this connection is a case which has been extremely thoroughly described by *Morelle* in 1934. A woman aged 51 had for two months been suffering from fatigue, lack of appetite, nausea and slight pains in the epigastrium. Suddenly, on the 2nd of Dec. 1933, persistent vomiting began, accompanied by severe pains in the epigastrium. She was admitted to hospital on Dec. 16th 1933: An examination revealed a resistance on the right side of the neck, tenderness all over the abdomen and signs of renal irritation (isolated white and red blood corpuscles in the sediment) as well as a mild leucocytosis in the blood. The sedimentation reaction was somewhat heightened. During the following months the patient's condition improved somewhat, but later on the fatigue and the nausea returned, and, in April 1934, the vomitings also. During the whole stay at hospital the patient had severe obstipation. The temperature was as a rule normal, but presented a few peaks towards 38° C. The sedimentation reaction gradually returned to normal. X-ray studies revealed delayed gastric and intestinal passage and also a diffuse moderate decalcification of the skeleton. Laboratory findings: Hypacidity, retarded elimination of induced hyperglycaemia, hypercalcaemia (about 18 mg %), increased calcium excretion in the urine, negative calcium balance and hypophosphataemia (1.8—1.4 mg %).

A parathyroid adenoma, 22 × 17 × 20 mm was extirpated. It consisted of eosinophile polygonal cells; here and there atypia. After the operation a mild tetania of short duration appeared but then the serum values for calcium and phosphorus became normal and the calcium balance positive. Nausea, vomitings and abdominal pains disappeared and the obstipation grew much better. The patient's gastric juice again contained free HCl and the number of leucocytes became normal.

The cases of acute hyperparathyroidism which are *a priori* absolutely clear are the ones that have a rapid and lethal course. *Morelle's* case, however, can no doubt be looked upon as a subacute or chronic hyperparathyroidism with repeated, mild acute exacerbations, because its clinical picture agrees on the whole with the one obtained in acute parathormone poisoning in man and animal (cf. *Lowenburg* and *Ginsburg* above). In spite of the non-lethal course *Morelle's* case has therefore been quoted here as an

extreme representative of a whole series of similar cases of hyperparathyroidism of gastro-intestinal type (cf. *Morelle* 1934, *Gutman* et al. 1934 and *Halshofer* 1937), mostly for the purpose of clinical comparison with the undoubted cases of acute lethal hyperparathyroidism given below.

### 3. *Acute lethal hyperparathyroidism.*

The case which has earlier been observed by the present author (*Mellgren* 1936) was of the same gastro-intestinal type as *Morelle's* case but with a considerably quicker course and an autopsy finding not previously described, namely multiple thromboses.

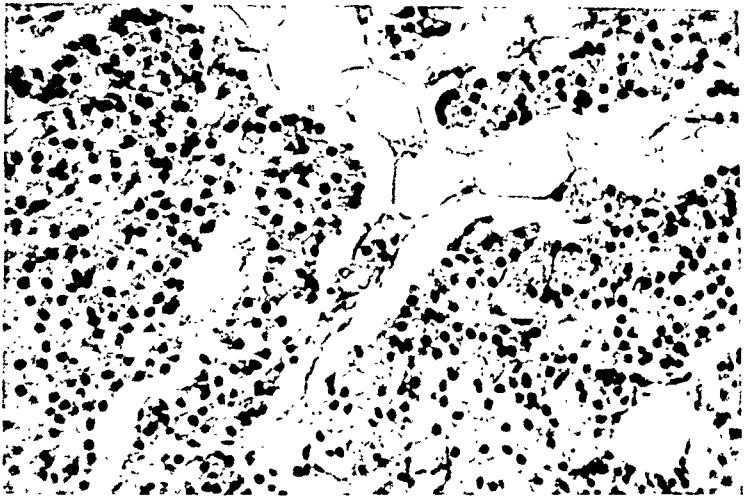
A woman aged 41, who had previously been healthy, was taken acutely ill with persistent vomitings, irregular mild pains in the epigastrium and increasing exhaustion. After a few days there was also a passing dry cough. After a week she was admitted to hospital. She was then tired and weak. The throat was slightly flushed. A systolic murmur could be heard over the heart and the blood pressure was 165/115 mm Hg. No other symptoms at the physical examination. Laboratory examination on admission showed: Erythrocytes 4.78 mills; leucocytes 14000 with 12200 polynuclear and 1800 mononuclear cells; hemoglobin 90 %; sedimentation reaction 53 mm in an hour; a faint trace of albumin but no sugar, urobilin or urobilinogen in the urine and a few leucocytes and erythrocytes in the urine sediment. — During the whole stay at hospital the temperature kept around 39° C.

On the fifth day after admission she suddenly felt back pains. On the sixth day a laboratory examination showed: Erythrocytes 4.97 mills; leucocytes 36900, with 92.5 % neutrophiles; hemoglobin 100 %. In the afternoon she was cyanotic, the pulse rapid, the blood pressure 65 mm Hg., and the blood sugar 0.19 %. She died the following day.

The post-mortem examination showed numerous fresh thrombi in different parts of the vascular system, particularly in the kidneys. Further, a faint myocardial fibrosis was found and also widespread calcium deposits in the myocardium and in the tubular apparatus of the kidneys. No signs of inflammation or chronic changes in the kidneys were present, however. In addition to numerous thrombi the lungs presented small local areas of stasis, and in the latter here and there a mild catarrhal-pneumonic reaction. At first only one parathyroid was found. It measured 17 × 15 × 11 mm and was composed of chief cell like elements



in compactly trabecular arrangement. The real nature of the enlarged parathyroid, and thus of the whole case, was not made clear until the microscopic examination. On this account the other parathyroids were not systematically sought for, the skeleton was not examined and the gastric mucosa was not microscopied. At a renewed investigation of the preserved material I found two more parathyroids, however. After fixation in formalin and embedding in paraffin they measured  $7 \times 4 \times 4$  and  $9 \times 4 \times 3$  mm respectively. Histologically they presented somewhat differing pictures. Thus, one



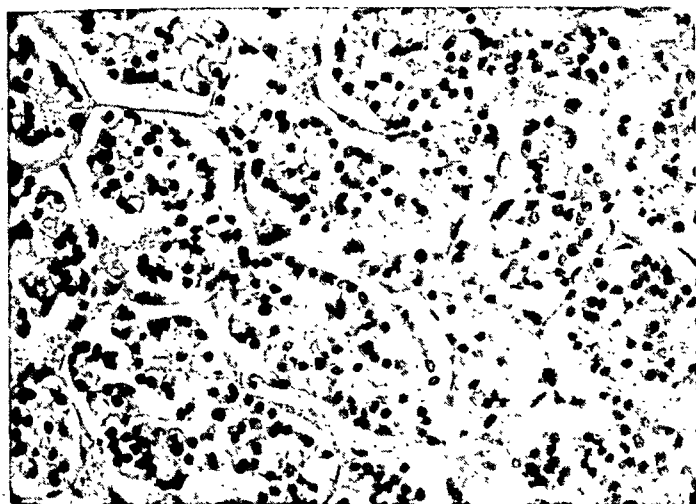
*Fig. 4.*

Case I. One of the non-adenomatous parathyroids. Normal arrangement of cells, which for the most part consist of normal-sized or slightly enlarged chief cells. Accasional water clear cells and small groups of oxyphiles.  $\times 250$ . Htx, van Gieson.

contained a fairly abundant amount of interstitial fat and its parenchyma cells were arranged in little irregular heaps and trabeculae with only very sparse follicle formation. The cells were mostly normal sized or slightly enlarged chief cells (diameter, medium  $8.54 \pm 1.85$  my) with rather few interspersed water clear cells and isolated little groups of oxyphiles (Fig. 1). The other, larger gland was practically free from fat and consisted almost exclusively of water clear cells (diameter medium  $10.4$  my). The latter were mostly arranged in heaps or columns with the eccentrically placed nuclei facing the abundant surrounding capillaries, which gave the impression of a glandular structure. Real glandular spaces or follicles were sparse and only rarely filled with colloid. (Fig. 2). The stroma

was slender and scanty. In a very small area in one of the poles of the gland the picture agreed, however, with the one presented by the other parathyroid.

In spite of some details lacking in the clinical and in the anatomical examination, the diagnosis must be considered certain. Obviously, the diagnosis of acute fatal hyperparathyroidism is supported partly by the parathyroid adenoma



*Fig. 2.*

Case I. The larger of the non-adenomatous parathyroids. Water clear cells in pseudoglandular arrangement. Almost no interstitial fat.  $\times 250$ . Htx, van Gieson.

observed, partly by the conformity of the clinical picture and the calcium metastases with these conditions in animals poisoned by parathormone (cf. *Collip* 1925, 1926, 1927, *Hueper* 1927 a. o.).

The case is of particular interest because the clinical and anatomical pictures are not blurred by findings other than the myocardial fibrosis and the bronchopneumonias. The former was extremely slight and can at most have contributed to the terminal circulation insufficiency. The bronchopneumonias were few and quite small, and were only present in local stasis areas peripheral to fresh thrombi. The broncho-

pneumonic centres thus must have been terminal and could at most have contributed to the rise of temperature and the leucocytosis during the last days, as well as to the final circulation insufficiency. Other symptoms have to be ascribed to the parathyroidism.

The report by *Hanes* in 1939 is probably the first to deal with a case of acute hyperparathyroidism with lethal issue, diagnosed on purely clinical grounds. In a woman aged 49, pyelitis was diagnosed in 1926 and a right-sided hydro-nephrosis in 1932, as well as calcium in the kidneys. The serum calcium was at that time 12 mg%, the sugar 100 mg% and N. P. N. 50 mg%. From May 1936 there were occasional pains under the right shoulder blade. In 1937 pains anteriorly in the right side of the chest; she became weak and constantly lost weight.

On admission to hospital on Sep. 21, 1937, the temperature was 38.2° C., the pulse 120, blood pressure 148/90 mm Hg. At the left lower pole of the thyroid there was a round, firm nodule, about 2 cm in diameter. Blood: Erythrocytes 3.5 mills; hemoglobin 66 %; leucocytes 6200. Urine: A trace of albumin and 10 W. B. C. per high-power field. X-ray studies revealed both kidneys to be »filled diffusely with a mottled deposit of calcium, typical of the changes seen in hyperparathyroidism. All of the bones show generalized loss of calcium«. She had a slight fever daily up to 38° C., increasing to 38.5° C. on the last two days of life. Throughout her stay the pulse was accelerated out of proportion to the fever. Blood examination showed calcium 20 rising to 22 mg%, phosphorus 4.7 rising to 4.8 mg%, phosphatase 23 Bodansky units and N. P. N. 58 mg%. A phenolphthalein excretion test on Sep. 28 showed 20 % excretion in 30 minutes and a total of 40 % in 90 minutes. — After two days of great weakness and nervousness she complained of generalized aching pain. The following morning she became cyanotic and dyspnoic and suddenly died.

The autopsy findings are described very briefly by *Hanes*.

A cystic and partly calcified and necrotic parathyroid tumour was found.<sup>1)</sup> The other parathyroids were not mentioned.

Further finds were a »chronic tubular and glomerular nephritis«, hepatic focal necrosis and calcification of the kidneys and myocardium »to a marked degree, together with widespread evidences of injury to connective tissue throughout all the organs. This was seen most conspicuously in the basement membranes of the parenchymatous organs, associated with cell necrosis and calcification. Calcium deposits were also present in the stomach and lungs to a slight degree. There was widespread calcification of the media of arterioles in the heart, kidneys and lungs«. Nothing is said about the skeleton.

The diagnosis of hyperparathyroidism with acute exacerbation is indisputable in *Hanes's* case. As to the mode of death *Hanes* says: »There is no evidence that this patient's death was due directly to the kidney injury which was present... Her sudden death suggested circulatory failure«. He maintains, however, that the anatomical myocardiac injuries were not in themselves sufficient to explain death; a »direct« parathormone poisoning must also have contributed.

Neither can *Oliver's* two cases of hyperparathyroidism, reported in 1939, be taken to be fully clear as regards the causes of death.

Case I: A woman, aged 57, suffered for six months from loss of strength and weight. During two weeks she had anorexia, increasing constipation, nausea and vomiting. On examination she was very drowsy. Temp. 36.1° C. Blood pressure 160/100. The urine contained albumin, occasional red blood cells and granular casts, numerous white blood cells and hyaline casts. The patient became increasingly stuporose, with a progressive fall in blood pressure and a terminal rise

---

<sup>1)</sup> This tumour is referred to by *Oliver* (1939) as »composed of chief cells«; regarding the cell type nothing is to be found in *Hanes's* work (1939).

of temperature, pulse-rate and respiration rate. She died nine days after admission.

The post-mortem examination revealed a chief cell parathyroid adenoma ( $38 \times 18$  mm; the other parathyroids not mentioned), necrosis and calcification in kidneys, heart, stomach, lungs and liver, and in the vessels in many other organs. Further finds were hyaline thickening of intima of the vessels in many organs; the kidneys showed intimal hyaline degeneration of the interlobular vessels and of a few glomerular afferent arterioles and occasional hyalinized glomeruli. No macroscopic evidence of decalcification or cyst formation of the bones. The blood calcium was 17.4 mg% and the urea in the cerebrospinal fluid 110 mg% post mortem.

*Oliver, Case II:* A woman, aged 56, had suffered for two months a year previously from repeated vomiting, anorexia, severe pains in the abdomen and chest, and obstinate constipation. Three months before admission there was a return of exactly similar symptoms, which only became worse. On admission she was pale, drowsy, and vomited repeatedly. Temp.  $36.7^{\circ}$  rising to  $37.2^{\circ}$ . Pulse-rate 100. A small tumour was discovered at the left lower pole of the thyroid. The heart was slightly enlarged. Blood pressure 104/86. The lungs had râles at both bases. The abdomen was tender all over. General depression of the reflexes. Laboratory findings: Hemoglobin 61 %; erythrocytes 4.66 mill.; blood urea 176 mg%. Albumin in the urine. The patient became comatose and died three days after admission.

The post mortem examination showed a chief cell adenoma of the left inferior parathyroid ( $25 \times 5$  mm; the other parathyroids not mentioned), arteriolar sclerosis of the kidneys, generalized heart dilatation, acute congestion of liver and lungs with pulmonary oedema, widespread necrosis and deposition of calcium in kidneys, lungs, heart and stomach, and in the vessels in nearly all the organs. No macroscopic evidence of decalcification of the bones. The blood calcium was 19.6 mg% and the urea in the cerebrospinal fluid 60 mg% post mortem.

*Oliver* rightly considers that the clinical course and the extensive calcium metastasization, together with the enlargement of the parathyroids, allow the diagnosis of acute hyperparathyroidism in both cases. He further supposes that in both cases death was directly due to the results of the acute hyperparathyroidism. This is probably true of his first case. In the second one, however, it must be remembered that the uraemia observed can have been due to the chronic renal changes, which were obviously not due to the parathyroid hyperfunction.

*Arnold's* case (1940) is of special interest as being the second published case where the section picture was dominated by multiple thromboses. This case deals with a 40-year-old man, who had previously been healthy. He suddenly fell ill with persistent abdominal pains and constant vomiting. After a successive change for the worse and loss of weight during four weeks, he showed a poor general condition with peripheral coldness, irregular action of the heart and slight tenderness in the epigastrium. Three days later the laboratory examination showed: Sedimentation reaction 7—15 mm; hemoglobin 100 %; albumin in the urine; many leucocytes, and a few erythrocytes and granular casts in the urine sediment. A week later he became worse. The temperature, which previously had fluctuated between 36.4° and 37.6° rose to 38.5° C. and the pulse to 120. On the following day he died during increasing circulatory insufficiency.

The post mortem examination revealed multiple thromboses in different parts of the vascular system, and two parathyroid adenomas, one measuring 60 × 30 × 30 mm and the other 18 × 9 × 6 mm. Both consisted in the main of two types of cells, elements resembling normal chief cells and such as were of water clear cell type. Generally the cells were greater than the corresponding normal types, and often atypical in form. The cells were arranged in irregular columns. In addition, the large adenoma was partly cystic and showed many infarcts. Only two other parathyroids were found,

14 × 8 × 4 and 11 × 4 × 2 mm in size, chiefly composed of slightly enlarged chief cells, the greater part of them arranged in glandular or rosette formations and follicles. Many nuclei of the parathyroid cells, as well as those of the adenomas, contained calcium.

There were further found a general osteoporosis (no histological examination), widespread calcium metastases in most of the organs (myocardium, kidneys, lungs, trachea and bronchi, stomach, duodenum, pancreas, liver, thyroid, vessels and skeleton muscles) and calcium gravel in the renal pelves, and also slight arteriosclerosis. Finally, there was glomerulonephritis chronica, healed TBC in the right lung tip, a scarified and healed duodenal ulcer, nodous colloid struma, infarcts in the liver and necroses in the pancreas.

*Arnold* maintains that the acute hyperparathyroidism in his case was probably set up by the chronic glomerulonephritis.

*Smith and Coke's* case (1940), which dealt with a 44-year-old woman, is also remarkable by reason of multiple thromboses. The patient had suffered from bone pains and constipation for two years; a limp developed and the thighs became slightly bowed. She was admitted 8/8 1939 for abdominal pains, vomiting and constipation. After some days free from discomfort the abdominal pains and vomiting recurred and drowsiness set in. She died 24/8. Laboratory examination had revealed a little albumin and a few erythrocytes and leucocytes in the urine. Blood (24/8): Count normal, sugar 85 mg%, urea 155 mg% and calcium 23 mg%.

Summary of post mortem examination: A chief cell parathyroid adenoma (25 × 20 × 20 mm; the other parathyroids not mentioned). Generalized osteitis fibrosa. Widespread calcinosis in the kidneys and pancreas (no calcium revealed in other organs; no special staining technique used). Multiple thromboses in the kidneys with stasis phenomena, and in the pancreas with block necrosis of gland and interstices and

slight inflammatory reaction of lymphocytes and polynuclear cells. Heart small with dilated right side and lung congestion. No evidence of chronic renal damage.

*Smith and Cooke* rightly suggest that death in their case was due to an acute crisis supervening upon chronic hyperparathyroidism.

It now remains to review the case recently observed by the author.

### *Case report.*

*Case II.* Autopsy 420/41. Woman aged 51. 7 brothers and sisters, of whom one had had gastric ulcer and two had had gastric trouble of unknown kind.

The patient had had a goiter since childhood. From the age of 24 (1914) she had increasing, periodic, gastric trouble: Pains in the epigastrium about  $\frac{1}{2}$  an hour after meals, sometimes with vomiting after food and pyrosis. She was treated for this several times at the Academic Hospital in Upsala, the first time in 1916 under the diagnosis »Dyspepsia«.

*From status 1916:* Thyroid diffusely enlarged, soft. Circumference of neck 33 cm. Abdomen: Some tenderness when pressed to the left in the epigastrium and over the left iliac fossa. No occult blood in the faeces. Test meal: Congo +? Total acidity 25. No lactic acid. X-ray of stomach normal. Nothing of interest otherwise.

Again admitted 1933. *From status:* Thyroid moderately enlarged, soft. Circumference of neck 36.5 cm. Abdomen: Tenderness to the right of the umbilicus. Blood: Hb 95 %. No occult blood in the faeces. Fractionated test meal: Total acidity 65, free HCl 45. X-ray of bile ducts: No sure contrast filling of the gall-bladder. X-ray of stomach normal. Nothing of interest otherwise.

With ulcer diet, the stomach troubles were mitigated or disappeared for short periods (maximum 1 year). After 1931 there was periodic shortness of breath; otherwise no heart trouble.

She was fit in the summer of 1941. From about the 15/9 1941 she grew rapidly worse: Increasing vomitings after all food, only slight abdominal pains, very constipated and progressive loss of flesh. She was in bed since the beginning of October.

She was in the Medical Dept. of the Academic Hospital in Upsala from 29/10 1941. *From status on admission:* Tired. Cyanosis of the lips. No dyspnoea or oedema. Superficial lymph glands: Size varying from a pea to a bean, not tender, at the angles of the jaw in the axillae and groins. Thyroid: A firm resistance is palpated on the



right lobe, the size of a hazel-nut. Thyroid otherwise somewhat enlarged. No thyreotoxic symptoms. Lungs normal. Heart: 3 + 9 cm. Faint, soft, systolic murmur at the apex. Blood pressure 170/120 mm Hg. Abdomen: Soft, somewhat tender in the middle of the epigastrium, otherwise normal. Reflexes normal. Laboratory examinations: Blood: Hb 98 %. Erythrocytes 4.8 mills., leucocytes 8000, of which 7000 were polynuclear and 1000 mononuclear. S.R. 9 mm/1 hr. Urine: Specific gravity 1.008; no albumin, sugar, urobilin or urobilinogen; sediment normal. Fractionated test meal: Free HCl 0, total acidity 40.

The 1/11 she was restless and confused. From the 3/11 there was jaundice and increasing apathy; she was only with difficulty able to answer when addressed. From the 4/11, albuminuria, and urobilin and urobilinogen pos. in the urine. On the 4/11, the blood pressure was 120/80 and N.P.N. 95 mg %. The 5/11 N.P.N. 103 mg %, Meulengracht 27, blood sugar 160 mg %, Cl 344 mg %, NaCl 567 mg % and S.R. 23 mm/1 hr. The temperature, which had previously remained subfebrile at the clinic, rose during the 4/11 and 5/11 to 38.4°, with simultaneous rise of the pulse to 120. In spite of nicetamide, tonocard, insulin and glyucose given subcutaneously, the patient died the 5/11.

The autopsy was made 21 hours later and showed as follows:

Slight jaundice. *Calvarium, cerebral membranes, brain and basal cerebral vessels* normal. *Basal sinuses* contain cruor clots of unusually firm consistency. *The cardiac sac* contains 30 cm<sup>3</sup> of clear yellow liquid; surfaces smooth. *The heart* of normal size and shape and fairly firm consistency. Here and there on the back of the heart the flesh appears through the pericardium as though covered with a gray-white powder. The heart cavities contain clots to the usual extent, but they are practically exclusively cruor clots of a considerably firmer consistency than usual. All the heart cavities are of usual breadth and wall thickness. The valves and orifices of the right heart are normal. The mitral orifice will hardly admit a finger. Along the terminal borders of both valves these is a garland of about five extremely fragile, light-red, verruciform modules, the largest the size of a small grain of rice. The borders of both valves are moderately thickened; the chordae tendineae are shortened and thickened. The aortal orifice is of usual width. No depositions. The terminal borders of adjacent valves grow together several mm. The valves otherwise are normal. The endocardium in the left auricle is distinctly thickened and milk-white. The endocardium otherwise is normal. Both auricles are filled with fragile, dark grayish-red thrombi, partly adhering to the wall. The foramen ovale is closed. The coronary vessels are wide, with normal intima and without

pathological content. The cardiac flesh is everywhere speckled with gray, dry, as though powdered, and with the well-defined powder-grains collected here and there in conglomerates at most the size of a pin's head. The flesh is rather more fragile than usual.

In the *venous system* dark grayish-red, fragile thrombi, not adhering to the walls, are met with in several places, as in the *vena renalis sin.*, completely obturating it and with a  $\frac{1}{2}$  cm long tail reaching into the *vena cava*; further, thrombi of several cm in length in the *venae hypogastricae communes* on both sides, and in the *venae femorales* on both sides; smaller thrombi in several places in the *plexus vaginalis* and the *plexus haemorrhoidalis*, and one the size of a grain of rice in the *sinus cavernosus sin.*

The *larynx* is normal. In the *trachea* and the larger *bronchi* there is a moderate amount of cloudy, yellowish mucus. The membranes are slightly reddened. The *pulmonary sacs* are normal. The *lungs* macroscopically normal except for a slight yellowish discoloration. The section surfaces flow with clear serum.

*Tongue, pharynx, oesophagus* and *peritoneum* normal. The *stomach* is of usual size and shape. The mucosa is pale, grayish-white, and is marked like shagreen within the whole of the corpus portion. The duodenal mucosa immediately distal to the pylorus is contracted with a scarred surface over an area the size of a finger tip, and intimately connected with the underlying muscle. The large and small intestines are normal.

When the *gall-bladder* is pinched, a mucose, colourless liquid comes out of the *papilla Vateri*. The gall-bladder is rather large containing a colourless mucous and about 40 yellow-white, faceted stones, about the size of a pea. The mucosa of the gall-bladder is smooth and white. In the cystic duct a similar stone, the size of a pea, is wedged; the stone practically entirely obturates the lumen of the duct. The *choledochous* and the *hepatic ducts* are free, of usual width with mucosa coloured by bile.

The *liver* is somewhat small, of normal shape and consistency, but considerably more yellow than usual. The capsule is smooth. The section surface shows here and there a slightly stronger marking of the lobules. The *pancreas* is congested but otherwise normal.

The *tonsils* are atrophic.

The left lobe of the *thyroid* is barely the size of a hen's egg, smooth and firm. The cut surface is gray-brown and glassy. The right lobe is only slightly larger than normal and is otherwise like the left one.

*Parathyroids*: On the site of the right upper parathyroid, there is a formation, well marked off from the thyroid, the shape of a plum. It measures  $30 \times 21 \times 20$  mm. Its upper pole is occupied by

two lobules, the size of a cherry. Otherwise the formation has a smooth surface. It is somewhat firmer than the thyroid and has a thin capsule of connective tissue. Its cut surface is uniformly grayish-yellow with a haemorrhage in the centre about as large as a pea. On the section through the upper part, the cherry-sized lobules are seen demarcated from the main part of the formation by fine strands of connective tissue (fig. 3). The right lower para-

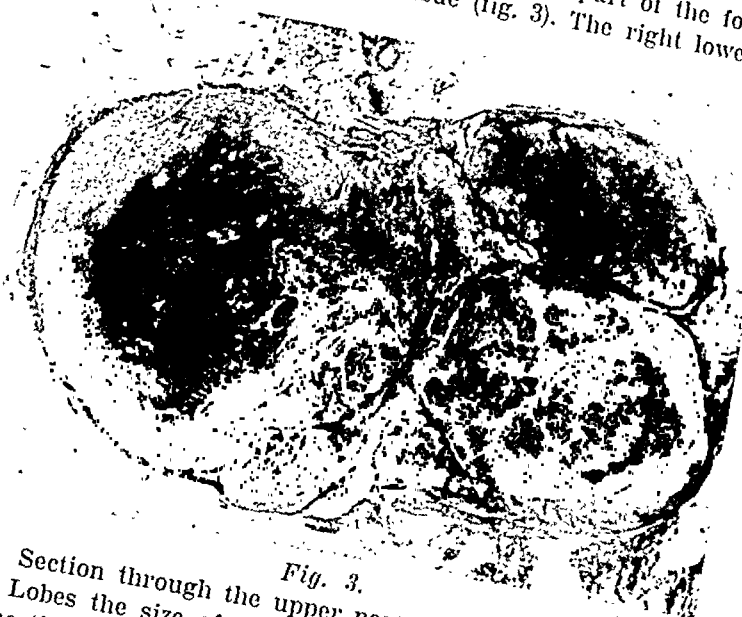


Fig. 3.

Case II. Section through the upper part of the adenomatous parathyroid. Lobes the size of cherries demarcated by strands of connective tissue. Within the lobes are small nodules.  
 $\times 4.5$ . Htx, van Gieson.

thyroid measures  $10 \times 4 \times 3$  mm, the left upper parathyroid  $10 \times 3 \times 3$  mm and the left lower one  $6 \times 2.5 \times 2$  mm, all of usual shape and with a brownish-yellow colour.

On the site of the *thymus* are two lobes the size of a finger and resembling adipose tissue. The *spleen* is rather large and congested with blood. The *suprarenals* are normal. The *hypophysis* normal.

The *kidneys* resemble one another. They are of usual shape and slightly smaller and limper than normal. The borders of the cut are slightly swollen. The outer surface is on the whole smooth, but depressed here and there by small, irregular scars. The surface of the cut gives a very motley impression; out of all the veins issue, like earthworms out of the ground, a large number of obturating,

grayish-red, fragile thrombi, which do not adhere to the vessel walls. The parenchyma is a pale grayish yellow. *The renal pelvis, ureters and bladder* are normal.

*The ovaries* are atrophic, slightly gyrate. *The tubes* are normal. *The uterus* is small, firm, of usual shape. The mucosa is thin and pale.

*The bone system:* The cranium is normal. The vertebral bodies



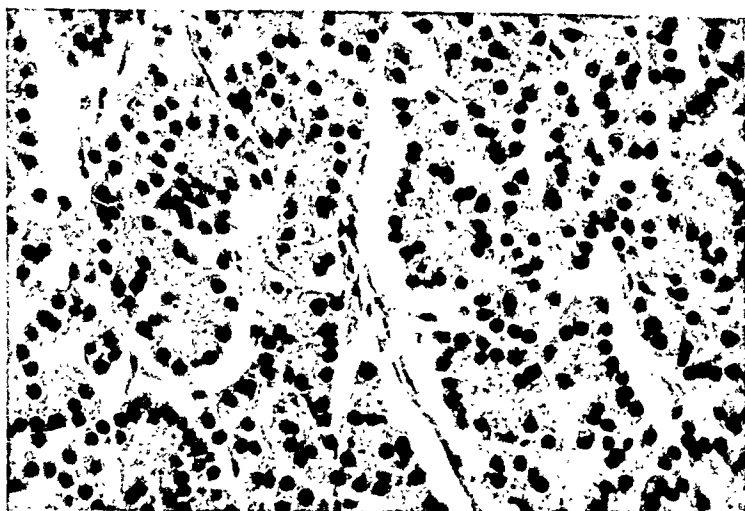
Fig. 4.

Case II. From the adenomatous parathyroid. On the left, part of the nodule with glandular structure. On the right, atypical chief cells in a close mosaic.  $\times 48$ . Htx, van Gieson.

can be sawn through more easily than usual; have an extremely thin cortical, loose spongiosa with marrow of usual colour. In one of the lower lumbar vertebrae is a soft brown patch on the sawn surface, the size of a pea. The ribs break with utmost ease. Their marrow is macroscopically normal. The breast bone and alae os. il. are sawn through more easily than usual. The femora are sawn through to their entire length. The upper epiphyses and diaphyses are normal. In the central part of the right lower femoral epiphysis, an area of spongiosa the size of a child's hand is compact and pale with a brown tint; it is also permeated with scattered, soft, intensely brown patches up to the size of a pea. In the left lower femoral epiphysis, there is a similar focus, the size of a finger-tip.

*Microscopic examination:* The formation on the site of the upper right parathyroid shows a nodous structure. Fine strands of connective tissue project from the thin, continual capsule into the

parenchyma, dividing off large lobes. Within these lobes, again, the parenchyma forms in several places small, rounded nodules, which are not as a rule incapsulated by connective tissue (fig. 3). In a number of the nodules the parenchyma exhibits a marked glandular or pseudoglandular structure. Thus the cells are mainly arranged into rosettes or follicles, which nevertheless only occasionally enclose a minimal lumen, filled with colloid. The single cells are fairly

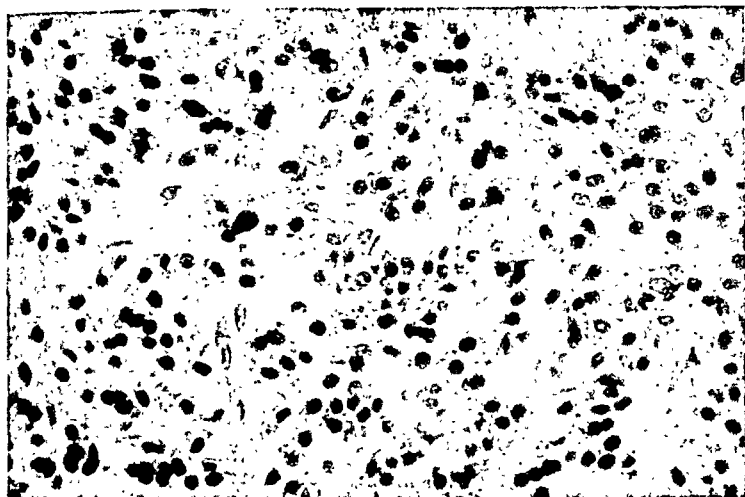


*Fig. 5.*

Case II. From the adenomatous parathyroid. Part of the nodule corresponding to the left part of fig. 4. Hypertrophic chief cells in pronounced glandular arrangement.  $\times 270$ . Htx, van Gieson.

uniform, about  $10 \times 14$  my large, polygonal with foamy faintly eosinophile protoplasm and rounded, usually basally situated nuclei, about  $7 \times 7.5$  my large, which display a close, intertwined chromatin network (figs. 4 and 5). These cells must therefore be regarded as hypertrophic chief cells (rose-red cells). A more atypical tissue is for the most part found round the nodules. Its boundary seems sometimes to be sharp, but a narrow transition zone is found almost everywhere (fig. 4). This atypical tissue also forms the greater part of the largest lobe. The tissue consists of a close, irregular mosaic of parenchyma cells, which in the main recall chief cells. The cells vary greatly in size, however, from about  $4.5 \times 4.5$  my to about  $19 \times 33$  my, and are as a rule considerably larger than normal chief cells. They have a faintly eosinophile, foamy protoplasm, which in several places is vacuolized. The nuclei vary in

size from  $4 \times 4$  my to  $10 \times 12$  my. They are usually round or oval, seldom knobby or rod-shaped. A number of nuclei have a delicate chromatin network, others are pyknotic. No mitoses. All parenchymal parts have a sparse connective tissue stroma, with numerous capillaries. In the centre of the largest lobe are extensive haemorrhages. In a preparation stained with Sudan, the parenchyma cells contained abundant red-stained drops over only quite small



*Fig. 6.*

Case II. From the adenomatous parathyroid. Area corresponding to the right part of fig 4; atypical chief cells in close mosaic.  $\times 270$ . Htx, van Gieson.

areas. For the most part they are free from fat or contain at most occasional, extremely fine granules of it. No interstitial fat.

*The left upper parathyroid:* Moderate fat infiltration. The cells are arranged almost throughout in small follicles or garlands, with nuclei basally; occasionally they surround a minimal lumen, which sometimes contains a small drop of colloid. The cells are almost without exception chief cells measuring on an average  $9.4 \times 11$  my; the smallest are about  $7 \times 9$  and the largest  $12 \times 16$  my. Their nuclei vary very little in size and measure on an average  $5.9 \times 6.6$  my. It is possible to find a few water clear cells and some single oxyphiles. A fair abundance throughout of fat-stainable granules in the parenchyma cells. In two places in the adipose tissue outside the gland, small groups are found of about ten rounded glandular spaces of about 20 to 60 my in diameter. The groups lie near the vessels of the parathyroid. The separate glandular spaces or follicles

are surrounded by fine strands of connective tissue and are made up of cubic or polygonal epithelial cells in single or double layers. The epithelial cells bear a striking likeness to the chief cells, although they are rather larger as a rule, with a larger and more porous nucleus than normal chief cells. (Fig. 7).

*Left lower parathyroid:* There is less fat infiltration and a less marked glandular structure in the central parts, but otherwise it is like the left upper parathyroid (fig. 8).



Fig. 7.

Case II. *a.* part of the left lower parathyroid. *b.* groups of rounded glandular spaces beside the vessels of the gland.  $\times 63$ . Htx. van Gieson.

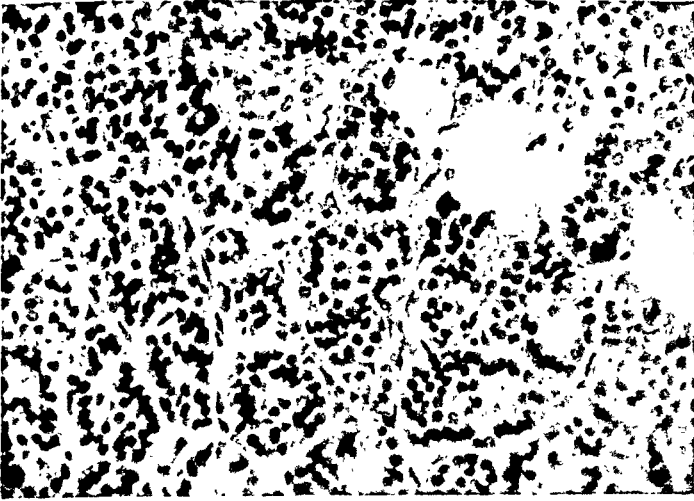
*Right lower parathyroid* is like the left upper one (fig. 9).

The posterior lobe of the *pituitary gland* is normal. The anterior lobe contains fairly large numbers of pale granulated basophiles and numerous degranulated basophiles according to *Kraus*. Otherwise nothing worthy of notice.

*Thyroid:* Nous colloid struma with moderately large follicles invested with low epithelium. The colloid is even; in *Kraus* — stained slides it is preponderatingly blue but distinctly red over small areas. The stroma is sparse without lymphocyte infiltrate.

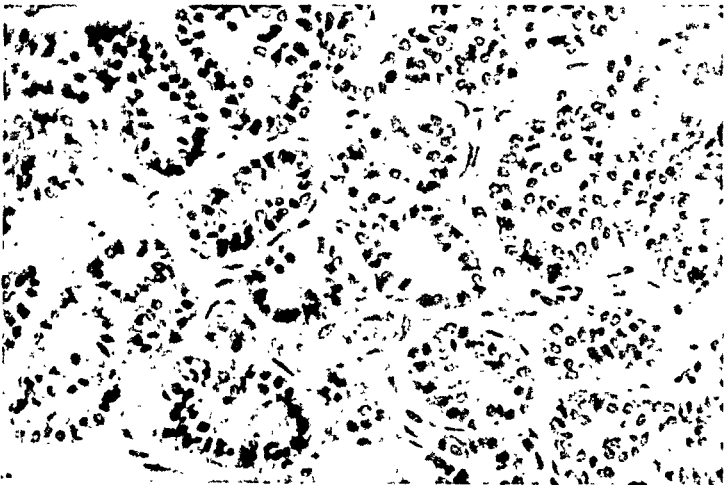
*The suprarenals* are like one another: The cortex is fairly broad and poor in lipoid, the marrow is normal.

In the adipose tissue lobes on the site of the *thymus* there are quite small remains of thymus tissue with numerous *Hassall's*



*Fig. 8.*

Case II. From the left lower parathyroid. Slight fat infiltration and glandular or pseudoglandular cell arrangement. Almost exclusively slightly enlarged chief cells.  $\times 250$ , Htx, van Gieson.



*Fig. 9.*

Case II. From the right lower parathyroid. The glandular structure is very pronounced. Almost entirely slightly enlarged chief cells.  $\times 250$ , Htx, van Gieson.



corpuscles. The ovaries are slightly fibrosized without primordial ovula, follicles or corpora lutea.

*Heart:* In a section from the left auricle there is here and there a powdery calcification in the inner layer of the endocardium. The myocardium shows everywhere, and especially in the left chamber numerous small groups of highly calcified bundles of muscles. There is no cell infiltration. The elastica interna of the myocardiac vessels and the adjacent parts of the intima and media are very calcified in several places (fig. 10).

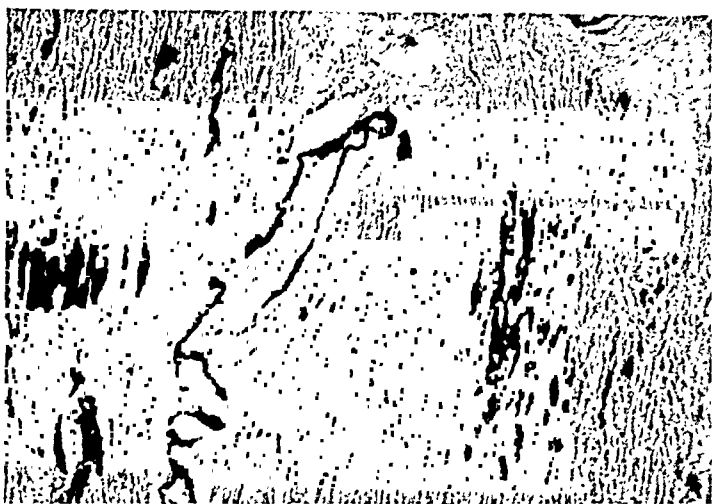
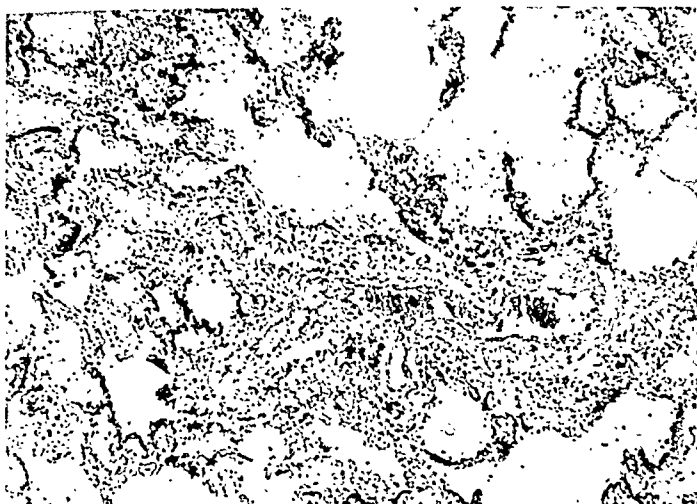


Fig. 10.

Case II. Calcification of muscular fibres and vessels in the myocardium.  $\times 56$ . von Kossa's calcium reaction.

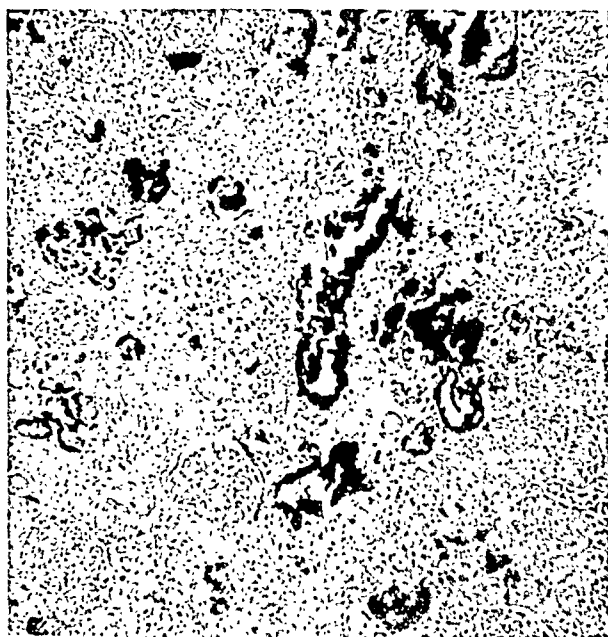
*Lungs:* There is acute stasis, oedema in patches and bronchopneumonia over quite small areas. Here and there there is calcification, partly in the alveole walls, partly subepithelially in the bronchi walls and partly, finally, in the intima of the pulmonary vessels (fig. 11). A fresh thrombus can be seen in a small pulmonary vein.

*Kidneys:* The picture is dominated by calcification. Thus numerous canals have calcified basal membranes; many also have calcified epithelium, and some few contain granules of calcium in the lumen. There are small calcium patches in occasional glomeruli and glomerulus capsules. Further, occasional quite small groups of hyaline glomeruli are seen, surrounded by a somewhat fibrosized stroma with small, sparse masses of round cells and one or two hyaline arteriolus. The great majority of glomeruli and arterioli



*Fig. 41.*

Case II. Calcification in the alveolar walls of the lung.  
× 56. von Kossa's calcium reaction.



*Fig. 42.*

Case II. -Calcification in the kidney. Glomeruli on the whole normal.  
No chronic changes. × 56. von Kossa's calcium reaction.

are nevertheless normal, as are also the larger arteries. In several places there are fresh, obturating thrombi in the veins, which have normal walls. The absence of calcification in the vascular walls of the kidney is remarkable. The stroma of the renal medulla has been slightly coarsened by fibres. Only one or two of the medullary canals contain small calcium squamæ (fig. 12).

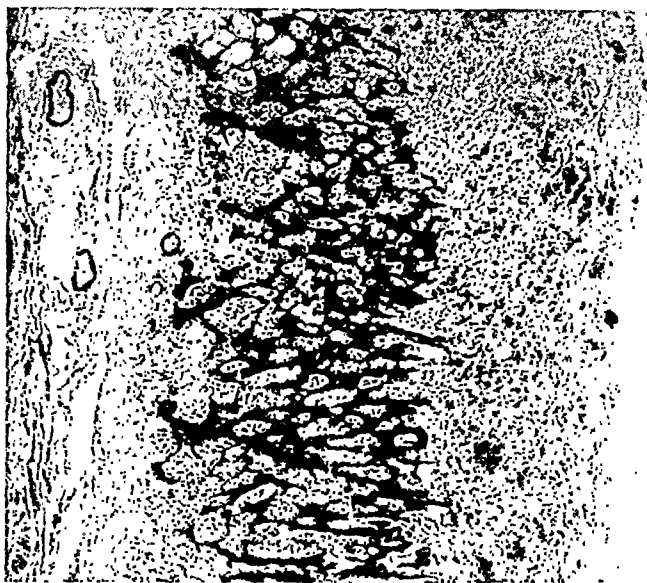


Fig. 13.

Case II. Calcification in the deep parts of the gastric mucosa and in the walls of small vessels.  $\times 56$ . von Kossa's calcium reaction.

*Stomach:* The deep parts of the mucosa's delicate stroma are everywhere subjected to a close precipitation of calcium granules. The elastica interna and intima of a number of fine arteries and veins between the muscularis mucosae and the muscularis are calcified (fig. 13). *Liver:* Slight stasis. In patches there is just a little bile pigment in the hepatic cells and the stellate cells, and occasional fine, intra- and inter-cellular bile thrombi. No calcium. *Spleen:* Stasis and moderate pulpal fibrosity. No calcium.

*Bone system:* Focus in the right lower femoral epiphysis: The marrow of the bone is fibrous. Osteoclasts are found here and there, within lacunae, close by the sparsely lying and abnormally narrow bone trabecules, which have lamellar structure almost throughout. For the most part, however, the bone trabecules are enclosed by a single layer of endothelium-like cells with narrow nuclei. Only oc-

casional, small parts of the trabecules have no lamellar structure and are surrounded by numerous osteoblasts. There are numerous rounded »giant cell tumours« of 1—2.5 mm in diameter, indistinctly demarcated and formed of fibrillary tissue with a great number of polygonal or rounded cells, the last rich in protoplasm, and multinucleated giant cells of epuloid type. Haemorrhages and iron



*Fig. 14.*

From the right lower femoral epiphysis. Osteitis fibrosa with »giant cell tumour« to the left. On the boundary-line of the tumour can be seen small, newly formed, non-lamellar bone trabecules.

× 60. Htx, van Gieson.

pigment here and there (fig. 14). The focus in the left lower femoral epiphysis resembles that in the right femur. The bodies of the vertebrae agree one with the other. The marrow is mainly ordinary cellular marrow with small interspersions of fat cells. The cortex is thin, in several places perforated. The bone trabecules of the spongiosa are everywhere very far apart, and are abnormally narrow, lamellar almost throughout, and have numerous lacunae with osteoclasts. Only occasionally are there small, non-lamellar depositions and osteoblast seams. Here and there also narrow seams of fibrous marrow round the bone trabecules and in the haversian canals are seen. In the vertebral body of L5 a »giant cell tumour« is met with, the size of a pea, resembling those in the femurs.

The ribs display in principle the same pictures as the vertebrae, but no »tumours«.

*Summary of the case report:* A 51-year-old woman with struma since childhood, ulcer troubles from the age of 24 and periodic shortness of breath from the age of 41. After a period free from symptoms, they set in acutely. After six weeks' increasing vomitings, slight abdominal pains and tiredness, the clinical examination showed prostration, lip cyanosis, a palpable resistance the size of a hazel nut connected with the right thyroid lobe, a systolic murmur over the heart and slight tenderness in the epigastrium. The temperature was subfebrile, sedimentation reaction 9 mm/1 hr. and blood pressure 170/120. Slight leucocytosis and no free hydrochloric acid in the gastric juice. Slight jaundice, further exhaustion, and albuminuria gradually set in. With values for temperature, sedimentation reaction and N. P. N. rising, and with high values of sugar, Cl and NaCl in the blood, she died from circulatory insufficiency after seven weeks of illness.

The post mortem examination revealed a parathyroid adenoma,  $30 \times 21 \times 20$  mm in size, and composed partly of hypertrophic chief cells in glandular arrangement, partly of similar but more atypical cells in a close mosaic (figs. 3, 4, 5 and 6). The other parathyroids measured  $10 \times 4 \times 3$ ,  $10 \times 3 \times 3$  and  $6 \times 2.5 \times 2$  mm; histologically slightly enlarged chief cells prevailed almost entirely in a marked glandular arrangement (fig. 8). Further, there was a strong general osteoporosis with slight, extended osteitis fibrosa changes (fig. 14) and widespread calcification in the myocardium, lungs, kidneys and stomach (figs. 10, 11, 12 and 13). A striking element in the section picture was the presence of numerous fresh thrombi in widely separate parts of the vascular system.

There was finally established a chronic endocarditis of the mitral valve with verrucous exacerbation, general acute stasis and a slight pulmonary oedema, small bronchopneumonias, cholelithiasis with an obturating stone in the cystic duct, bile thrombi in the liver and slight general jaundice, a scar after a duodenal ulcer and a nodous colloid goiter.

The case is complicated by the many and probably independent affections which appear in the patho-anatomical finding. The banal nodous colloid goiter, which has plainly been there since childhood, can consequently be regarded as a secondary finding, of no importance to the clinical course. On the other hand it is of course possible that the goiter, like the parathyroid enlargement, are signs of a general proliferation tendency in the endocrine organs. The scar from the ulcer, further, can be linked up with the patient's stomach trouble earlier, but has plainly not played any part in the latest phase of the disease. The gall-stones have possibly contributed to the previous chronic gastric troubles. Since the terminal jaundice was plainly an obstructive hepatic jaundice (bile thrombi in the liver), it is not unnatural to suppose that it was caused by a passing stone. The endocarditis, finally, explains the patient's ten-year periodic shortness of breath and probably contributed to the slight rise in the temperature as also to the circulatory insufficiency during the last illness.

There then remains the last acute phase of the illness, dominated by increasing vomitings and exhaustion, and the patho-anatomical findings from the parathyroids and bone system, the extensive calcium metastases and the multiple thrombi. The foregoing survey makes it clear that these observations justify the diagnosis of acute lethal hyperparathyroidism. It is less certain if an element of chronic hyperparathyroidism is reflected in the section findings, for it is doubtful whether the bone changes observed have arisen in the short time of seven weeks during which the acute symptoms set in. This question can not be determined with certainty, as osteitis fibrosa often, and perhaps usually, runs its course for a lengthy period without subjective symptoms (*Halshofer* 1937). On the other hand, many sure cases of chronic hyperparathyroidism are known which showed symptoms for a considerably longer time than the case here, and which in spite of this had less pronounced bone changes (*Colby* 1934; *Albright, Baird, Cope* and *Bloomberg* 1934;

*Castleman and Mallory* 1935). Supported by a large material of chronic cases, *Albright* and co-workers also maintain (1934: 2) that marked osteitis fibrosa is rather a sign of long duration than a hasty development of hyperparathyroidism. It is therefore very probable that the bone changes observed in my second case, are signs of an earlier chronic and latent period of the disease.

### *Discussion.*

In the previous pages seven certain cases of acute hyperparathyroidism or possibly chronic hyperparathyroidism with acute exacerbation have been cited — namely those of *Mellgren* I (1936), *Hanes* (1939) *Oliver* I and II (1939), *Arnold* (1940), *Smith* and *Cooke* (1940) and *Mellgren* II (recorded above). For the purposes of clinical comparison I have also given *Lowenburg* and *Ginsburg's* observations (1932) of experimental parathormone intoxication in the human subject and *Morelle's* case (1934) of subacute hyperparathyroidism with gastro-intestinal symptom picture. The main data are collected in table 1.

The clinical picture of acute hyperparathyroidism such as it can be obtained from the table differs but little from the picture already pointed out by *Oliver* (1939). The picture is thus dominated by asthenia and, as a rule, vomiting and abdominal pains, all or these symptoms gradually increasing. In contrast to *Oliver's* supposition, it is found that constipation and loss of weight, though usual, are inconstant symptoms, as are also bone pains and fever. Albuminuria and impaired renal function can probably, on the other hand, be regarded as characteristic of the syndrome, although sometimes they did not appear until the end (*Mellgren* II). The terminal circulation insufficiency also seems to be typical; *Oliver* (1939) has rightly put forward disproportionate tachycardia and progressively falling blood pressure.

Unfortunately, the blood calcium and phosphorus have been investigated in all too few of the acute cases for definite

Table 1.

Case	Clinical main symptoms											Autopsy					
	Age and sex	Asthenia	Vomiting	Abdominal pains	Constipation	Loss of weight	Bone pains	Terminal circulatory insuffic.	Parathyroid palpable	Fever	Urine: albumin	Impaired renal funct.	Blood calcium and phosphorus resp.	Parathy. hyperplasia	Widespread calcific.	Widespread thromboses	Osteitis fibrosa
Mellgren I 1936	41 ♀	+	+	+		0	0	+		+	+			+	+	+	
Hanes 1939	49 ♀	+				+	+	+	+	+	+	+	20—22 4,7—4,8	+	+		
Oliver I 1939	57 ♀	+	+		+	+	0	+		+	+	+	(17,4) —	+	+		0
Oliver II 1939	56 ♀	+	+	+	+	+	(+)	+	+	0	+	+	(19,6) —	+	+		0
Arnold 1940	40 ♂	+	+	+		+		+		+	+			+	+	+	+?
Smith & Cooke 1940	44 ♀	+	+	+	+		+			0	+	+	23 —	+	+	+	+
Mellgren II 1943	51 ♀	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Lovenburg & Ginsburg 1932	5 ♂	+	+					0	0	+			19,6 4,4			Recovered	
Morelle 1934	51 ♀	+	+	+	+			0	+	+	0		18 1,8—1,4			Recovered	

A blank square means no records, 0 means that the symptom was not found.



conclusions to be drawn. It does seem, however, as though they were distinguished not only by very high serum calcium values but also by high values for the serum phosphorus (cf. the cases of *Lowenburg* and *Ginsburg* 1932, and *Hanes* 1939). In animals with parathormone poisoning a terminal rise of serum phosphorus has also been observed (*Collip* 1925: 2, and others). As against this, *Morelle's* subacute case shows the same low phosphorus value as chronic hyperparathyroidism without renal insufficiency in general. It is therefore tempting to agree with *Albright's* opinion (cited by *Hanes* 1939), that parathyroid poisoning complicates the hyperparathyroidism »when the blood calcium rises above a certain critical point. At this critical point the serum phosphorus, instead of being low, starts going up because phosphorus is no longer diffusible at very high levels of calcium« (*Albright*, cited by *Hanes* 1939). On the other hand it is possible that the impaired renal function of the acute lethal cases induces the raised phosphorus value. In any case it is plain that increasing serum phosphorus forms an important prognostic sign, probably indicating a rapidly fatal course, if the patient is not operated upon (cf. *Albright* cited by *Hanes* 1939).

Further noteworthy symptoms which are due to the hyperparathyroidism have been noted in some of the acute cases. This applies to accelerated sedimentation reaction (*Mellgren* I), leucocytosis of the blood (cf. *Mellgren* 1936; cf. also *Halshofer* 1937 concerning leucocytosis in chronic hyperparathyroidism), disturbance in the conversion of sugar (*Morelle*, *Mellgren* I and II; cf. also *Köhler* 1942 concerning diabetes in chronic hyperparathyroidism) and hypochylia gastrica (*Morelle*, *Mellgren* II).

The duration of the symptoms of disease in the cited acute lethal cases have varied, the shortest time being a fortnight.

On the whole, then, the clinical syndrome of acute hyperparathyroidism is not very characteristic, most nearly resembling an »acute abdomen«. No sharp boundary-line can be drawn between it and chronic hyperparathyroidism (cf.

Gutman 1934, Morelle 1934, Snapper 1940, and others); the acute hyperparathyroidism constitutes often, and perhaps always, an exacerbation of a chronic one (cf. the cases of Hanes, Smith and Cook, and also Mellgren II). The diagnosis must therefore build on the same investigations as in hyperparathyroidism in general, i. e. first and foremost on chemical blood investigations. As Hanes stated, the diagnosis can sometimes be given on the characteristic X-ray picture of the kidneys which is produced by calcium deposition.

The pathological anatomy in the acute, exacerbating lethal cases of hyperparathyroidism is dominated by parathyroid hyperplasia, widespread calcification and, in four of the seven cases, multiple thromboses. As has already been contended, a major part of the skeleton changes — osteoporosis or osteitis fibrósa — found in some of the cases are probably the result of a previous phase of the disease.

The calcium metastases in the acute lethal cases are remarkable for their spread to organs where they are only seldom observed in chronic, non-exacerbating hyperparathyroidism (heart, lungs, stomach, etc.).

The widespread thromboses constitute an absolutely specific element in the pathology of the acute exacerbating lethal hyperparathyroidism, hardly ever seen in any other condition. In my case I (Mellgren 1936) — probably the first one of this kind recorded — there were about ten thrombi the size of a grain of rice on the chordae tendineae in the right cardiac chamber, large numbers of thrombi in the fine pulmonary arteries in all pulmonary lobes, an obturating thrombus in the right renal vein, smaller thrombi in the left renal vein and numbers of them in the left interlobulares and arcuatae of both the kidneys. All the thrombi were fresh. In Arnold's case (1940) there were fresh thrombi in the pulmonary arterial branches on both sides, in numerous renal arterial and venous branches in the kidneys on both sides, in many portal vein branches in the liver, in the pancreas, in one parathyroid adenoma and in several veins of the up-

per leg and pelvis. In *Smith* and *Cooke's* case (1940), early thrombosis was found in some of the veins of the renal pelvis, and at the junction of the cortex and medulla, and in a few smaller arterioles and capillaries of the kidneys, as well as early venous thrombosis of the pancreas. In my second case, finally, early thrombosis was found in both auricles, in a smaller branch of the one pulmonary vein, in large numbers of small veins in both kidneys; a large fresh thrombus obturated the left renal vein and fresh thrombi were also found in the femoral veins, the hypogastric veins, the plexus haemorrhoidalis and the sinus cavernosus sin.

There can be no doubt that these thrombi, observed also in vessels without histological wall changes (*Mellgren* I and II), indicate an intensive thrombosis tendency in the blood. That this *thrombo-diathe-sis* is a fundamental in the pathological anatomy is shown by the fact, already mentioned above, that *Hueper* (1927) found multiple thromboses in dogs with parathormone poisoning.

The cause of the *thrombo-diathe-sis* is not certain. *Hueper* (1927) assumed that the highly increased blood calcium augments the coagulability of the blood and in this way favours the formation of thrombi. It is a well known fact with regard to the human subject also that parathormone increases the coagulation tendency of the blood parallel with the raising of the blood calcium level (*Cantarow* and others 1926, *Bume* and *Liu* 1932, *Lowenburg* and *Ginsburg* 1932, *Marx* 1933, and others). As I have said earlier on (*Mellgren* 1936), the raised blood calcium is probably not the only cause of the diathesis. The increase of the blood's thrombokinase, which was found by *Bume* and *Werber* (1932) after parathormone injections on rabbits, may be a further factor of importance.

One of the most characteristic findings in parathormone poisoning of dogs is a strong terminal increase of the general concentration of the blood (*Collip* 1925: 1 and 2, 1926, 1927, and others); *Cantarow* and co-workers (1926) have found a tendency to increased blood concentration in human beings already after injections of small amounts of parahormone.

The same phenomenon probably also sets in with spontaneous acute lethal hyperparathyroidism in the human subject. Thus the number of erythrocytes and the hemoglobin value rose terminally in my first case, and in my second high values for Cl and NaCl in the blood were found terminally. An increase like this of the blood's concentration — and therefore of its viscosity — can in itself be thought to contribute to the formation of thrombi.

Granted that the pathogenesis of the *thrombo-diathe-sis* is obscure, it nonetheless seems clear that the multiple thrombi in widely separate parts of the vascular system must play a decisive part in the fatal issue. This should be observed in the treatment. It is plainly rational, while waiting to operate, to administer liquid intravenously, as *Lowenburg* and *Ginsburg* (1932) tried out successfully in experimental parathormone poisoning in the human subject. It may be that heparine, too, has a part to play here.

In three of the seven acute lethal cases, no thromboses are recorded. In two of these (*Hanes* and *Oliver* I) the probably immediate cause of death was circulatory insufficiency, probably due to the myocardial calcification, and in one (*Oliver* II) it was uraemia.

As to the parathyroid hyperplasia recorded in the acute lethal cases, no consistent divergence from the conditions in nonexacerbating chronic hyperparathyroidism can be advanced. Thus *Hanes* (1939) found a »parathyroid tumour« and *Oliver* (1939) as *Smith* and *Cooke* (1940), record chief cell adenomas in their cases, but nothing is said of the other parathyroids. The cases mentioned can thus be explained as examples of over-functioning »primary« adenomas according to *Castleman* and *Mallory's* classification (1935 and 1937; cf. Introduction).

On the other hand, the parathyroid changes in both my cases, and also in that of *Arnold*, differ distinctly from *Castleman* and *Mallory's* schema.

*Arnold* (1940) has rightly maintained that in his case

the chronic glomerulonephritis recorded was probably the primary change, and the cause of the hyperparathyroidism. It is therefore interesting that he found not only two hyperplastic parathyroids of the type *Castleman* and *Mallory* take as distinguishing secondary »renal« hyperparathyroidism, but also two adenomas, which did not differ histologically from the so-called »primary« parathyroid tumours (hyperplastic and atypical cells). It must surely be assumed, with *Arnold*, that the adenomas also were secondary to the kidney damage.<sup>1)</sup>

On the other hand, both my cases, as well as having apparently primary adenomas also had hyperplastic changes of the remaining parathyroids, despite the absence of chronic renal changes. Thus, in my first case one of the macroscopically normal parathyroids was built up almost entirely of water clear cells, and had no interstitial fat; in the second case all three non-adenomatous glands were fairly large ( $10 \times 4 \times 3$ ,  $10 \times 3 \times 3$ , and  $6 \times 2.5 \times 2$  mm), and differed histologically from the normal picture by marked glandular and pseudoglandular structure (cf. *Castleman* and *Mallory* 1935 and 1937), and by a preponderance of slightly hypertrophic chief cells, while there were practically no oxyphile cells and the interstitial fat was scanty.

A comparison with *Bergstrand's* works (1921, 1931 and 1938) is of value to a correct assessment of these observations, for *Bergstrand* has observed cases of hyperparathyroidism with apparent renal genesis where the parathyroids were very large and showed the same picture of adenomatous parastruma as the »primary« parathyroid enlargements. This is plainly the parallel to *Arnold's* observation, cited above. *Bergstrand* also observed cases of renal hyperparathyroidism with

---

<sup>1)</sup> The opposite possibility, i. e. primary adenoma with hyperparathyroidism and renal calcification with secondary renal insufficiency — which in its turn leads to hyperplasia of the remaining parathyroids — has been put forward by *Johnson* (1939), and also by *Downs* and *Scott* (1941). This possibility cannot however apply to *Arnold's* case, where glomerulonephritis was the fundamental cause of the renal insufficiency.

multiple adenomatous new growths in several of the parathyroids but lying in an otherwise unaltered parenchyma.

On the other hand, *Bergstrand* found in several cases of apparently primary parathyroid enlargement changes of parathyroid remains outside the adenomatous nodules. He writes: »In summary it may be said that the so-called idiopathic enlargement of the parathyroid has the character of multiple adenomatous newly formed nodules in a diffusely altered parenchyma. The analogy to an adenomatous colloid goiter is obvious.« (*Bergstrand* 1938). He also issues a warning not to let the schematic division into primary and secondary hyperparathyroidism be valid as more than a temporary working hypothesis.

In other words, parathyroid adenomas cannot solely on their histological structure be taken as primary, purely endogenous new formations. From my observations, compared above with those of *Bergstrand*, it must further in all likelihood be concluded that in many cases of so-called idiopathic or primary hyperparathyroidism, not only the adenoma but also remains of parathyroid tissue outside the tumour or the remaining parathyroid glands are responsible for the hormonal hypersecretion. The same is indicated by the observation that the exstirpation of apparently normal parathyroids can have a good effect on hyperparathyroidism, even in cases where there was adenoma (cf. *Hellström* 1935). The development of *Mandl's* famous, first operated case of hyperparathyroidism is also striking: Six years after the exstirpation of the parathyroid tumour the patient had a relapse; at the autopsy morphologically intact parathyroids were found, but no adenoma (*Mandl* 1938). *Hamperl* has pointed out that such relapses occurred in several similar cases (*Hamperl* 1938).

Thus the morphological findings established speak for the possibility of the so-called idiopathic hyperparathyroidism being secondary to superior endogenous or exogenous factors in the same way as the renal type, the adenomas constituting only secondary phenomena to the hypersecretory impulse.

Judging from experimental discoveries, it is not unlikely that an exogenous impulse of this kind can be due to lack of Vitamin D (cf. *Quick and Hunsberger 1931, Nielsen and Stef-fensen 1941*).

It is at present impossible to determine whether the conclusions submitted can hold good of hyperparathyroidism in general. They can nevertheless be of interest as working hypotheses, not least with regard to the possibility that endocrine adenomas in general are reactive formations (cf. *Gellerstedt 1938, Mellgren 1942*).

### Summary.

1. A further case of acute lethal hyperparathyroidism is added to the six of the literature.

2. The clinical syndrome of acute hyperparathyroidism is not very characteristic, resembling most nearly an »acute abdomen«. The outstanding symptoms are asthenia and, as a rule, vomiting and abdominal pains, all of these symptoms gradually increasing. Further features are albuminuria, impaired renal function, and terminal circulatory insufficiency. Among the inconstant symptoms are constipation, loss of weight, bone pains and fever.

It is probable that the acute lethal hyperparathyroidism is distinguished not only by very high values for the serum calcium but also, as a bad prognostic sign, of high values for the serum phosphorus.

3. The pathology of the acute lethal hyperparathyroidism is dominated by hyperplastic parathyroid changes, widespread calcification and — in four of the seven cases — multiple thromboses.

4. The multiple thromboses, which are plainly the expression of an intensive *thrombo-diasthesis*, constitute a specific element in the pathology of acute hyperparathyroidism and are assuredly of great importance to the lethal issue.

5. The author's own cases of acute hyperparathyroidism

exhibited, as well as an adenoma in one of the parathyroids, certain hyperplastic changes in the remaining glands, which shows that the adenoma has no importance by itself. With *Bergstrand*, it does not take long to assume that the entire parathyroid organ in these so-called idiopathic cases reacted to a superior impulse other than the only one hitherto known, namely renal insufficiency.

## REFERENCES

- Albright, F., Aub, J. C., and Bauer, W. (1934: 1) *J. A. M. A.* 102, 1276.
- Albright, F., Baird, P. C., Cope, O., and Bloomberg, E. (1934: 2). *Am. J. M. Sc.* 187, 49.
- Arnold, W. (1940). *Virchows Arch. f. path. Anat.* 306, 427.
- Askanazy, M. (1904). *Arb. path.-anat. Inst. Tübingen* 4.
- Bergstrand, H. (1921). *Acta med. Scandinav.* 54, 539.
- (1931). *Ibid.* 76, 128.
- (1938). *Acta path. et microbiol. Scandinav., Suppl.* 38, 80.
- Bodansky, A., and Jaffé, H. L. (1931). *J. Exper. Med.* 53, 591.
- Boyd, W. (1910). *A Text Book of Pathology*. 3:th edit. Philadelphia.
- Bume, G. F., and Liu, T. C. (1932). *Beitr. z. Klin. d. Tuberk.* 79, 154.
- Bume, G. F., and Werber, E. (1932). *Klin. Wchnschr.* 11, 988.
- Cantarow, A., Caven, W. R., and Gordon, B. (1926). *Arch. int. Med.* 38, 502.
- Castleman, B., and Mallory, T. B. (1935). *Am. J. Path.* 11, 1.
- (1937). *Ibid.* 13, 553.
- Churchill, E. D., and Cope, O. (1934). *Surg., Gynec. & Obst.* 58, 256.
- Colby, F. (1934). *Ibid.* 59, 210.
- Collip, B. (1925: 1). *J. Biol. Chem.* 63, 395.
- (1925: 2). *Ann. Clin. Med.* 4, 219.
- (1926: 1). *J. A. M. A.* 87, 908.
- (1926: 2). *Am. J. Physiol.* 76, 472.
- (1927). *J. A. M. A.* 88, 565.
- Dawson, J. W., and Struthers, J. W. (1923). *Edinburgh M. J.* 30: 1, 421.
- Downs, R. S., and Scott, V. (1941). *Arch. Int. Med.* 67, 658.
- Drake, T. G. (1937). *J. Clin. Investigation* 16, 203.
- Gellerstedt, N. (1938). *Acta path. et microbiol. Scandinav., Suppl.* 38, 63.
- Gutman, A. B., Swenson, P. C., and Parsons, W. B. (1934). *J. A. M. A.* 103, 87.



- Halshofer, L. (1937). *Handb. d. spez. path. Anat. u. Histol.* (Lubarsch — Henke) 9: 3, 342. Berlin.
- Hamperl, H. (1938). *Acta path. et microbiol. Scandinav., Suppl.* 38, 107.
- Hanes, F. M. (1939). *Am. J. Sc.* 197, 85.
- Hellström, J. (1935). *Nord. med. tidskr.* 9, 331 and 375.
- Herxheimer, G. (1926). *Handb. d. spez. path. Anat. u. Histol.* (Lubarsch — Henke) 8, 636. Berlin.
- Herzenberg, H. (1933). *Zentralbl. f. allg. Path. u. path. Anat.* 57, 232.
- Hueper, W. (1927). *Arch. Path. & Lab. Med.* 3, 14.
- Jaffé, H. L., Bodansky, A., and Blair, J. E. (1930). *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 27, 710.
- Johnson, J. W. (1939). *Am. J. Path.* 15, 111.
- Köhler, B. (1942). *Nord. med.* 13, 227.
- Lowenburg, H., and Ginsburg, T. M. (1932). *J. A. M. A.* 99, 1166.
- Mandl, F. (1926). *Arch. f. klin. Chir.* 143, 245.
- (1938). *Cit. from Endokrinologie* 20, 217.
- Marx. (1933). *Arch. f. klin. Chir.* 175, 547.
- Mellgren, J. (1936). *Upsala läkaref. förh.* 42, 35.
- (1942). *Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path.* 106, 482.
- Morelle, J. (1934). *J. de chir. et ann. Soc. belge de chir.* 33 — 34, 178.
- Nielsen, H. E., and Steffensen, K. (1941). *Nord. med.* 9, 115.
- Oliver, W. A. (1939). *Lancet* 2, 240.
- Olsen, H. (1934). *Investigations on the metabolism of calcium in hyperparathyroidism.* Köpenhamn.
- Quick, A. J., and Hunsberger, A. (1931). *J. A. M. A.* 96, 745.
- Schellack, D. (1939). *Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path.* 103, 479.
- Smith, F. B., and Cooke, R. T. (1940). *Lancet* 2, 650.
- Snäpper, I. (1940). *Acta med. Scandinav.* 103, 321.

## STERILE ALCOHOL PREPARED BY AUTOCLAVING.

By *Henry M. Christensen & Poul V. Marcussen.*

(Received for publication, December 1st 1942).

The usefulness of ethylalcohol for surgical hand-disinfection and the storing of catgut is due to its disinfecting properties. That it is a rather weak disinfectant appears from several earlier works, in which it is also pointed out that alcohol may be unsterile. Sterile alcohol is known and produced, but it is used only to a small extent, being confined mostly to the institutes where the particular investigations are being made.

The chief purpose of the present investigation is the industrial sterilization of alcohol for surgical use and for the preparation and storing of catgut.

### *Previous Investigation.*

In all essentials the theoretical aspect of the question was gone into thoroughly before the end of last century.

Robert Koch 1881 was aware that anthrax spores are not killed by alcohol in 110 days. Epstein found that 100 per cent. alcohol has no disinfecting effect at all, whereas 50 per cent. alcohol will kill some bacteria strains. An outstanding survey was published by Minervini 1898, who found that cold alcohol affected non-sporulating bacteria (tetrigenus, prodigiosus, pyocyaneus, staphyl. aureus and coli) and that the effect was most marked when the alcohol was of a concentration of 50—70 per cent. No effect was observed on

sporulating forms (*subtilis*, anthracis). The effect of boiling alcohol was dependent on the boiling point, there being direct proportionality between the water content of the alcohol and its disinfecting properties.

For alcohol heated under pressure the following facts were established: At 125–130° C. for 30–60 minutes all test bacilli were killed with 25–50 per cent. alcohol; with 70 per cent. alcohol sterility was uncertain, and with 80–90 per cent. the sporulating forms tested all survived. However, the method employed, consisting of autoclaving cotton-wool plugged tubes of alcohol in an alcohol autoclave, permitted a heating period of only 30–40 minutes for 80–90 per cent. alcohol.

As early as in 1894 *Repin*, employing a rather different method (heat-sealed tubes of alcohol in a water autoclave) which permitted of a longer heating time, showed that sterility was complete after 60 minutes at 120°.

Thus at the beginning of the present century it was known that in certain strengths alcohol can kill bacteria but not spores, and that alcohol can be sterilized by heating under pressure.

The more recent literature has thrown light mainly on two facts, viz. that commercial alcohol is often unsterile, and that alcohol can be sterilized by filtering. The fact that the disinfecting effect of cold alcohol is best when the alcohol is in solution is confirmed by *Russ*, *Beyer*, *Gregersen* and *Christiansen*, all of whom have found an optimum at 70–80 per cent. *Ernst* alone found 90 per cent. alcohol to be most effective, and also that this concentration is sterile in contrast to 70 per cent. No particulars are given of technique and material. It is accordingly well proved that alcohol is not self-purifying, and that as a natural consequence commercial alcohol in many cases must be infected. Table 1 contains a summary of most of the bacteriological tests of alcohol. It will be seen that the flora demonstrated is fairly homogeneous, namely saprophytary sporulators mainly of the *subtilis* group. The number of infected samples fluctuates considerably partly because the technique (especially the size of the sample) has varied, partly because the initial material was of varying quality. It would be superfluous to discuss these investigations in detail.

In Denmark the question was taken up in 1937 at the suggestion of *Wulff*. *K. E. Jensen* found that stock samples from the Danish Distilleries (the central institution for the manufacture of alcohol) were sterile, whereas two of fifteen samples from laboratory containers taken haphazard gave growths.

Of 109 containers with 93 per cent. commercial alcohol *Dalsgaard* found growth in three samples, 2 × cocci and 1 × bacilli.

The works of *Schmidt* and of *Kuhn & Dombrowsky* were also of practical importance, it being shown that contaminated alcohol infected sterile catgut, and *Brüning's* work reporting on a case of instrument infection with Welch-Fränkels bacillus through alcohol. (See also *Jungmichel's* case).

*Accordingly it may be considered proved that alcohol can be infected and that it can transfer this infection to sterile things, and that commercial alcohol often is infected.*

In the preparation of sterile alcohol three methods have been employed in principle. Re-distillation is recommended by *Kuhn*, but advised against by *Dold* and *Kürchner* as being unreliable, as the bacteria are liable to be pushed to the condenser and alcohol's boiling point is too low to kill (*Schmidt*). Filtering has already been employed by *Stokvis* (Pasteur-Chamberland filter) and the method utilized i. a. by *K. E. Jensen* and *Dalsgaard*, who have both used a Seitz filter with nitrogen pressure. In 1098 filtered samples *Dalsgaard* found only  $13 \times$  bacilli and  $2 \times$  cocci and considered that this was due to air infection during the sterility tests. However, in 11 cases an inoculation from the filters (33) gave a growth of bacilli, in 3 cases growth of cocci, which strongly suggests that the flora was of the same nature before and after filtration. *Dalsgaard* has systematized the method at the Copenhagen Municipal Hospital. *K. E. Jensen* drew the conclusion that alcohol should be filtered of bacteria, but that it was a matter for consumers, an opinion which has been adopted officialy in Germany, where in fact the sterilization of spirits for surgical use is obligatory. Finally, autoclaving has been employed by *Minervini* and *Repin*, as already stated, and later on a larger scale for the sterilization of alcohol and catgut by *Jellet*, *Bardy*, *Triollet*, *Petit* and others, as well as in an experimental series on the sterilization of instruments with propyl-alcohol by *Walbum*. In the last-mentioned experimental series, however, the temperature was only  $104-105^{\circ}$ , at which good effects were obtained with propyl-alcohol, but insufficient effect with other alcohols.

### *Own Investigations.*

The method we have tested is first and foremost intended for the industrial sterilization of alcohol for surgical use and for the after-sterilization and storing of catgut, and it is employed on a large scale by Novo Therapeutic Laboratory in the manufacturing of catgut by the method indicated by *Christensen*. For industrial preparation autoclaving is the most simple and the quickest, for several hundred litres can

be handled in a short time, and in addition one rules out completely the personal element involved in changing filters, etc.

For the purpose of the experiments we employed a high-pressure autoclave of small size, capable of being regulated within temperature intervals of about 2°.

Six or eight tubes were filled with 5 g. of a 60—70 hour iodine-resistant\*) earth sample in 15 c.c. alcohol of the concentration to be tested. The tubes were placed in the autoclave in a rack together with a maximum thermometer, and half a litre alcohol of the same concentration was put into the autoclave receptacle. The autoclave was then screwed up and heated to the alcohol boiling point. After extracting the air the safety-valve was closed and the length of the test was taken from the time when the experimental temperature was reached.

### *Sterility Test.*

In this test employed a technique we had previously used in a preliminary test of commercial alcohol, which shall be mentioned only briefly as it led to nothing new. From three surgical departments we received vessels containing 20 litres of spirit intended for use in the operation wards. These samples were found to contain 4, 14 and 11 different rod-shaped sporulators of the subtilis group.

The testing of these quantities of spirit consisted of filtering through a small Seitz filter and cultivating the filter-plate itself. This technique was adopted because of *Konrich's* very important observation of the importance of the size of the alcohol sample. *Konrich* found growth from only 76 out of 192 samples of 1 c.c., but from 123 out of 162 samples of 50 c.c. Examination of the sediment after centrifuging, which seems to contain most of the bacteria (*Hansen & Blegen*) and which was previously employed by *Kuhn & Dom-*

---

\*) 1 per cent iodine in a 1.5 per cent aqueous solution of iodine of potassium.

Table I.

Previous tests with demonstration of bacteria in commercial alcohol.

Authors	Year	Bacteria found	No. of infected samples	Alcohol concentration
Stokvis	1909	Bc. megatherium	1 of a quantity of alcohol	Absolute alcohol.
Kuhn & Dombrowsky	1932	Subtilis, subtilislike red bac. Mesentericus, etc.	20 of 36	70% — abs. alcohol.
Knorr	1932	Subtilis, Mycoides, Mesentericus etc.	2 of 2	70%
Schmidt	1932	Mesentericus, Subtilis	2 of 4	96%
Eschenbrenner	1932	Various subtilislike sporulators	2 tanks 20 of 34	not stated 70% — abs. alcohol.
Jensen, V.	1933	Subtilis-like rods	?	not stated
Hansen & Blegen	1934	Mesentericus, Subtilis	0 of 63 (alcohol) 7 of 37 (sediment)	96% — abs. alcohol.
Konrich	1934	Rods with spores	123 of 162 Samples from 20 containers	not stated
Jensen, K. E.	1937	Not stated	2 of 35 (1 of 7 containers)	96% and abs. alcohol.
Dalsgaard	1934	Cocci and gram neg rods.	3 of 109	93%

*browsky*, was not suitable with the large quantities of alcohol.

For the cultures we employed beef broth with  $p_H$  8.2, sterilized by fractionated heating in Koch's steam sterilizer. The cultivation tests were made both aerobically and anaerobically (cf. *Christensen & Marcussen*).

The chief results of the investigations are shown in Table II, where will be found the minimum temperatures necessary to obtain sterility of the particular alcohol concentration with the use of the aforesaid spore material.

It appears from the table that the heating period seems to be of minor importance when one compares periods of 1, 2 and 3 hours, as in no case was sterility obtained in three

Table II.

Results of autoclaving alcohol for varying periods at different temperatures and alcohol concentrations (a = aerobic growth, an = anaerobic growth).

In each test 6 tubes were used for anaerobic cultivation and 6 for aerobic cultivation.

	95°	105°	115°	125°	135°	145°	155°
70% alcohol							
3 hours	+4a,5an	—	—				
2 hours	+2an	—	—				
1 hour	+6a,6an	—	—				
90% alcohol							
3 hours			+1a	—			
2 hours			+2a,1an	—			
1 hour			+5a,2an	—			
96% alcohol							
3 hours				+2a	—	—	
2 hours				+6a,2an	—	—	
1 hour				+6a,6an	—	—	
Absolute							
3 hours					+3a	—	—
2 hours					+2a,1an	—	—
1 hour					+2a,2an	—	—

hours when there was growth from the sample after one hour's autoclaving.

The results also confirm *Minervini's* observations, as the temperature necessary for sterilization seems to be directly dependent on the water content of the alcohol sample.

### Summary.

As a practical method of sterilizing alcohol in large quantities the authors recommend autoclaving in a high-pressure autoclave for one hour at the following minimum temperatures:

for 70 per cent. alcohol	105° C.
» 90 » » »	125° C.
» 96 » » »	135° C.
» absolute »	145° C.

The test material employed was a 60—70 hours iodine-resistant earth sample.

### BIBLIOGRAPHY.

1. *Bardy*: Gaz. Hop. Paris, 72, 907, 1899. (cit. c. Bulloch).
2. *Beyer*, A.: Ztschr. f. Hyg., 70, 225, 1912.
3. *Brüning*, F.: Deutsch. med. Wschr., 50, 717, 1924.
4. *Christensen*, H. M.: Acta patol. et microbiol. scand., 19, 482, 1942.
5. *Christensen*, H. M. & *Marcussen*, P. V.: Acta patol. et microbiol. scand.,
6. *Christiansen*, J.: Hosptid., 61, 65, 1918.
7. *Dalsgaard*, A. T.: Dansk Tidsskr. f. Farmaci, 14, 81, 1940.
8. — Archiv for Pharmaci og Chemi, 46, 33, 64, 1939.
9. *Dold*: Zbl. Bakt. I Abt., Orig. Bd., 84, 558, 1920.
10. *Epstein*, F.: Zschr. f. Hyg., 24, 1, 1897.
11. *Ernst*, J.: Hautdesinfektionsprobleme. Kbl., 1937. Levin & Munksgaard. S. 65.
12. *Eschenbrenner*, H.: Apoteker Zeitung, 47, 1578, 1932.
13. *Gregersen*, J. P.: Zbl. f. Bakt., 77, 168, 1916.
14. *Hansen*, K. & *Blegen*, E.: Norsk Mag. f. Lægevidensk., 95, 1448, 1934.
15. *Jellet*, H.: Lancet, 2, 379, 1896.
16. *Jensen*, K. E.: Dansk Tidsskr. f. Farmaci, 11, 197, 1937.
17. *Jensen*, V.: Hosptid., 76, 562, 1933.
18. *Jungmichel*, G.: Münch. med. Wschr., 85, 125, 1938.
19. *Knorr*, M.: Münch. med. Wschr., 79, 793, 1932.
20. *Koch*, R.: Mitt. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt Berlin, S. 263, 1881.
21. *Konrich*, F.: Apoteker Zeitung, 49, 612, 1934.
22. — Arb. a. d. Reichsgesundheitsamt, 67, 271, 1934.
23. *Kuhn*, Ph. & *Dombrowsky*, K. H.: Münch. med. Wschr., 79, 790, 1932.
24. *Minervini*, R.: Zschr. f. Hyg., 29, 118, 1898.
25. *Petit*, A. M.: J. Pharm.Chem. Paris, 21, 297, 1905.
26. *Repin*, C. C.: Ann. de L'institut Pasteur, 8, 170, 1894.



27. Russ, V.: Zbl. f. Bakt., Abt. I, 37, 115, 250, 1904.
28. Schmidt, A.: Die Med. Welt, 6, 1198, 1932.
29. Stokvis, C. S.: Zbl. f. Bakt., Abt. I, 48, 436, 1909.
30. Triollet, M. J.: Gaz. Hop. Paris, 77, 358, 1904. (cit. e. Bulloch).
31. Walbum, I. E.: Hosptid., 76, 251, 1933.
32. — Dansk Tidsskr. f. Hyg., 40, 241, 1937.
33. Wirgin, G.: Ztschr. f. Hyg., 46, 149, 1904.
34. — Ztschr. f. Hyg., 46, 149, 1904.
35. Wulff, H.: Hosptid., 76, 549, 1933.
36. Zeissler, J.: Münch. med. Wschr., 86, 251, 1939.

## STUDIES ON THE EFFECT OF SULPHAMETHYLTHIAZOLE ON NORMAL AND TUBERCULOUS GUINEA-PIGS

(THE WHITE BLOOD PICTURE, SERUM PROTEINS, PRECIPITIN  
FORMATION, ANAPHYLACTIC SHOCK, ARTHUS' PHENOMENON,  
RETICULO-ENDOTHELIAL REACTION)\*)

By *Jens Bing*.

(Received by the redaction 23th Dec. 1942).

Sulphamethylthiazole («Staphylamid») is one of the many chemo-therapeutics used in recent years. In the clinic it was employed for the first time in 1939 in America, whilst in Denmark it has been the subject of the work of several authors. Both at home and abroad it has been proved to be of good effect on a number of infections of various kinds.

Sulphamethylthiazole acquired renewed interest through some recent publications by *K. A. Jensen* and *I. Kier*,<sup>5)</sup> who have shown in the first place that the substance has an inhibitive effect on the growth of tubercle bacilli in vivo and in vitro, and in the second place that in experiments with guinea-pigs it inhibits the cellular preventive reaction of the living organism to tuberculous infection, it being found by the experiments of these authors that in the case of tuberculous infection guinea-pigs treated with sulphamethylthiazole had a much lower cell reaction in the tuberculous foci, as compared with untreated controls. At the same time it was

---

\*) This investigation was made with the financial assistance of the P. A. Brandt foundation.

observed that whereas the control animals had a positive cutaneous reaction to tuberculin, the animals treated with sulphamethylthiazole remained negative or more weakly positive.

The purpose of the present work was to ascertain whether in sulphamethylthiazole-treated guinea-pigs there are other signs of a reduction of the defence forces of the organism. With this in view an examination was made of the leucocyte and lymphocyte content of the blood of such guinea-pigs and also of their serum proteins. Furthermore, their ability to form antibodies against ox and horse serum was tested by means of precipitin determination and anaphylactic shock, and their cellular reaction by means of Arthus' phenomenon and the reaction of the omental reticulo-endothelial system, which is capable of being produced experimentally.

*Animals, treatment and method.* The animals used in the experiments were white guinea-pigs of various sizes (see tables), treated twice daily with a subcutaneous injection of 50 mg. sulphamethylthiazole per 100 g. body weight. As in the investigations of K. A. Jensen and Kiær the substance was finely powdered and employed in a 10 per cent. suspension in a 6 per cent. solution of gum arabic. This dosage ensures a fairly constant blood concentration per 5 mg.% throughout the 24 hours (Jensen and Kiær).

Leucocyte and differential counts were made on ear blood taken from the animals in the morning before the first injection and before the animals were fed; in several cases, however, they had eaten of the hay or of old food remnants before sampling. The serum proteins were determined by means of Henriques and Klausen's method.<sup>3)</sup> Precipitin determinations were carried out by means of mixing 0.1 c.c. serum and 0.5 c.c. antigen or antigen-dilution, whereafter the mixture stood for two hours in an incubator, followed by about 12 hours in a refrigerator. Arthus' phenomenon was produced by intracutaneous injection of 0.1 c.c. antigen, whilst the reticulo-endothelial reaction in the omentum was caused by repeated injections of a protein hydrolysate.

*Total-leucocytes, granulocytes and mononuclear cells* in the blood were counted in respect of four normal guinea-pigs (96, 97, 99, 100), which were examined seven times in the course of fourteen days. It will be seen from table 1 that

Table 1.

Animal	Date	Total-Leucocytes	Granulocytes	Mononuclears	Granulocytes in % of Leucocytes.
96 (580 g)	20/11-41	13,160	9,600	3,560	73
	21/11-41	12,560	9,160	3,400	73
	22/11-41	9,680	6,960	2,720	72
	24/11-41	7,240	5,140	2,100	71
	25/11-41	7,040			
	27/11-41	8,000	5,920	3,080	74
	4/12-41	12,080	6,390	5,690	53
97 (550 g)	20/11-41	10,360	7,150	3,210	69
	21/11-41	17,400			
	22/11-41	9,200			
	24/11-41	8,200	5,160	3,040	63
	25/11-41	9,720			
	27/11-41	8,200			
	4/12-41	7,320	5,130	2,190	70
99 (550 g)	20/11-41	8,640	5,440	3,200	63
	21/11-41	14,560			
	22/11-41	6,760			
	24/11-41	5,200			
	25/11-41	5,560			
	27/11-41	6,200			
	5/12-41	15,920	9,870	6,050	62
100 (540 g)	20/11-41	6,480	2,920	3,560	45
	21/11-41	12,320	8,650	3,670	70
	22/11-41	15,240			
	24/11-41	20,600			
	25/11-41	12,160			
	27/11-41	11,040	7,510	3,530	68
	5/12-41	13,240			

there may be marked variations from day to day, in both total values and the result of the differential counts; this may possibly be due to the circumstance that the animals were not fasting and perhaps also to various degrees of fear when the samples were taken. But the variations in the figures do not suggest that the treatment has any influence on the

*Table 2.*  
Leucocyte values from tuberculous guinea-pigs treated with sulphamethylthiazole and sulphathiazole.

No.	Weight	Time after infection	Duration of treatment	Total leucocytes	Granulocytes	Mononuclears	Granulocytes % of leucocytes
9122	500-520	12 days	11 days	12,800	9,070	3,730	71
9123	550-590	14 "	13 "	14,200	8,230	5,970	58
9124	540-500	16 "	15 "	6,320	3,280	3,040	52
9125	540-590	14 "	4 "	8,640	5,780	2,860	67
9126	490-530	16 "	6 "	4,920	2,860	2,060	58
9127	570-510	12 "	11 "	9,000	5,580	3,420	62
9129	510-480	14 "	13 "	10,640	7,450	3,190	70
9130	520-500	16 "	15 "	7,160	4,010	3,150	56

leucocytes. Nor in the case of five sulphamethylthiazole and three sulphathiazole-treated tuberculous guinea-pigs (kindly placed at my disposal by Professor *K. A. Jensen*) were there any abnormalities, in particular no granulocytopenia or reduction in the number of mononuclears (Table 2).

Table 3.

Serum proteins in sulphamethylthiazole treated, normal guinea-pigs.

No.	Duration of treatment	Total-protein	Albumin	Globulin	Relative albumin %
41	12 days	4.79	3.20	1.59	67
43	13 „	3.64	2.55	1.09	70
239	Untreated	5.00	2.73	2.27	55
240	„	5.08	2.78	2.30	55
241	1 month	4.15	2.30	1.85	57
242	1 „	3.32	2.04	1.28	61
237	1 „	2.77	1.96	0.81	71

*Serum proteins* were determined only in the case of five treated animals and two untreated controls. As will be seen from Table 3, there was a distinct reduction in the total-protein content for the treated animals compared with the controls. In two cases (241-242) the proportion of the protein fractions albumins and globulins, represented by the relative albumin per centage, i. e. the percentage of albumin in the total-protein, does not differ from that of the two normal animals; nor are the other three values definitely abnormal, as it is the usual thing to find this wide diffusion of the values in normal guinea-pigs (*Codounis*)<sup>2</sup>). There was hypoproteinaemia in the treated animals; presumably this was not due to the sulphamethylthiazole, however, but to the gum arabic, which is known to cause a reduction of the serum protein, no doubt as a result of the endeavour of the organism to keep the colloid osmotic pressure constant.

The determination of the formation of antibodies in both treated and untreated animals was arrived at by means of *precipitin tests* on guinea-pigs sensitized with ox or horse serum. From Table 4 it will be seen that five of the animals (37, 38, 39, 241, 242) were subjected to chemotherapy from

the very commencement of sensitization, whereas in two cases (26 and 27) treatment did not begin till three days before blood-sampling. In the other six cases serving as controls the sensitized animals received no chemotherapeutic treatment. As will be seen from the table, there is no difference in the

Table 4.

Result of sensitizing (precipitin development and anaphylactic shock) of sulphamethylthiazole-treated guinea-pigs and untreated animals.

Animal	Sensitized with ox-serum	Treatment	Precipitin-reaction titer					Shock-experiment after ca. 6 weeks
			1	10	100	1000	10,000	
26	1 month	3 days	++	(+)	—	—	—	Typical shock and death
27	1 »	3 »	++	(+)	—	—	—	» » » »
33	1 »	0 »	++	(+)	—	—	—	Died of hæmopericardium
34	1 »	0 »	++	(+)	—	—	—	Typical shock without death
35	1 »	0 »	++	(+)	—	—	—	» » » »
36	1 »	0 »	++	(+)	—	—	—	Died of hæmopericardium
37	1 »	1 month	++	(+)	—	—	—	Typical shock with death
38	1 »	1 »	++	(+)	—	—	—	» » » »
39	1 »	1 »	++	(+)	—	—	—	» » » »
Sensitized with horse-serum								
239	1 month	0 »	++	++	(+)	—	—	
240	1 »	0 »	++	++	(+)	—	—	
241	1 »	1 »	(+)	++	(+)	—	—	
242	1 »	1 »	(+)	++	(+)	—	—	

precipitin content of treated and untreated animals, except that the treated animals have an inhibition zone in undiluted serum that was not found in the untreated ones. (Unfortunately, no titration with undiluted serum was performed with the sera of the animals sensitized with ox serum).

In order to study from another angle the result of the sensitization of the treated and untreated animals, 0.5 c.c. serum was injected intracardially about six weeks later for the purpose of observing *anaphylactic shock*. In two of the control animals the injection was unsuccessful, the result being hæmopericardium and death. All the other animals had

Table 5.

Arthus' phenomenon in sulphamethylthiazol-treated normal and tuberculous guinea pigs

Animal	Weight	Time after beginning of:			Cutaneous-reaction in mm. after:			
		Sensitising with ox- serum	Treatment	Infection	3 hours	6 hours	12 hours	24 hours
26	545-590	3 weeks				25×21		20×14
		4 "	1 week			45×22		30×25
27	505-510	3 "				31×20		20×8
		4 "	1 "			30×20		55×30
33	600-605	3 "				31×20		24×15
34	620-675	3 "				28×20		25×12
35	550-575	3 "				35×17		25×19
		4 "				30×15		24×20
36	540-520	3 "				40×23		35×22
		4 "				40×20		30×20
37	535-390	3 "	3 "			45×25		40×25
38	600-450	3 "	3 "			38×25		40×25
39	595-530	3 "	3 "			35×22		30×13
		Sensitizing with horseserum						
237	370-430	4 weeks			26×34	26×38		unreadable
		4½ "			30×34	30×40	24×35	23×30
238	320-430	4 "			12×12	20×28		unreadable
		4½ "			25×24	30×24	30×20	20×16
239	370-420	4 "			25×31	20×28		unreadable
		4½ "			35×25	35×25	30×24	18×12
240	350-420	4 "			22×20	28×25		unreadable
		4½ "			25×25	31×27	35×22	15×12
241	300-370	4 "	4 "		18×15	20×20		unreadable
		4½ "	4½ "		35×25	35×27	30×25	15×14
242	310-340	4 "	4 "		18×15	20×20		unreadable
		4½ "	4½ "		25×20	28×20	22×16	15×12
237	530-445	3½ months			15×20		25×40	
		4¼ "	4 "		—	—		—
238	630-630	3½ "			18×22		25×31	
		4¼ "	4 "	4 weeks	—	—		—
359	390-500	4 weeks		4 "	5×4	5×4		4×3
357	390-340		4 "		—	—		—
358	320-340		4 "	4 "	—	—		—
360	300-300			4 "	—	—		—



typical anaphylactic shock with itching, hiccup, dyspnoea and convulsions. The sole difference between treated and untreated was that the untreated animals survived the shock, whereas those treated for a month, or even only three days, with sulphamethylthiazole all died in conjunction with the shock (Table 4).

K. A. Jensen and Kiær having observed abolition or weak-

Table 6.

Tuberculin-reaction in treated and untreated normal and tuberculous guinea-pigs. Three weeks after injection.

Animal	Sulphamethylthiazole	Tuberculous	Sensitized	Tub.-r. 24 hours	48 hours
237	+		+	—	—
357	+			—	—
238	+	+	+	8×5 (Erythema)	5×4 (Erythema)
358	+	+		9×5 (Erythema)	5×5 (Erythema)
359		+	+	15×12 (Infiltration)	10×9 (Infiltration)
360		+		16×13 (Infiltration)	10×10 (Infiltration)

ening of the tuberculin reaction in tuberculous guinea-pigs treated with sulphamethylthiazole, I examined the question of whether under the same conditions there is any change in the strength of *Arthus' phenomenon*. As will be seen from Table 5, this was done by comparing the value of the cutaneous reaction in untreated guinea-pigs with the reaction partly in guinea-pigs treated with sulphamethylthiazole prior to the commencement of sensitizing, and partly in those on which treatment began three weeks after sensitization and had lasted one week. It will be seen from the table that no difference was observed between treated and untreated animals. There were two exceptions, however, for guinea-pigs 237 and 238, which had reacted distinctly barely a month before, reacted negatively after the treatment. Of these two animals one, 237, had become very emaciated during treat-

ment and fell from 530 to 445 g. (Subsequent autopsy revealed no obvious cause). It is an interesting point that guinea-pig 359, which was examined at the same time and had *not* been treated with sulphamethylthiazole, but which was tuberculous after subcutaneous injection of 1/100 mg. TB., did not react normally either, but considerably more weakly to the cutaneous test. During the tuberculin test a few days earlier a considerable difference was observed between treated and untreated tuberculous animals (Table 6), corresponding to K. A. Jensen and Kiær's findings, which were also confirmed by the autopsy, for glandular and splenic tuberculosis was much more advanced in the untreated than in the treated animals.

As the tuberculous tissue reaction inhibited under chemotherapy is essentially reticulo-endothelial, I went into the question of whether during the treatment there is a reduction of the *reticulo-endothelial reaction in the omentum*, which can be induced by repeated intraperitoneal injections of a protein hydrolysate. An experiment with two treated and two untreated animals revealed no difference in the tissue reaction, but the two treated animals died on the ninth day after the commencement of the intraperitoneal injections, whereas the two untreated animals were unaffected by them.

### *Discussion.*

It will be seen that these investigations on the effect of sulphamethylthiazole on the white blood picture, serum proteins, precipitin development, shock, Arthus' phenomenon and omental reticulo-endothelial reaction, were unable to produce any parallel to the effect on the reactions of tuberculous tissue demonstrated by K. A. Jensen and Kiær. There was an exception in two of the nine experiments on Arthus' phenomenon in treated animals, as the cutaneous reaction which four weeks earlier had been distinctly positive, disappeared

under the chemotherapeutic treatment. One of these guinea-pigs (237) was not tuberculous, but during the treatment it lost weight rapidly, from 530 to 445 g. The other (238) was apparently not much intoxicated by the treatment nor did it lose weight, but it was tuberculous. In a third animal (359) which was tuberculous but *not* chemotherapeutically treated, the reaction was relatively weak. If any conclusion is to be drawn from these few exceptions, it must be that Arthus' phenomenon, which as a rule is unaffected by the dosage of sulphamethylthiazole that inhibits the tuberculin reaction, *may* be caused to subside during the treatment. *K. A. Jensen* and *Kiær* state that the inhibition of tuberculous tissue reactions is not a specific sulphamethylthiazole effect, as similar changes were found by *K. A. Jensen* and *Bindslev*<sup>4</sup>) in avitaminotic tuberculous guinea-pigs and by *Bindslev*<sup>1</sup>) in desensitized animals. And the inhibition of Arthus' phenomenon, which is of much rarer occurrence than the inhibition of the tuberculin reaction, does not seem to be a specific effect of the substance either, for as stated it was observed in an untreated tuberculous animal.

### Summary.

In conjunction with *K. A. Jensen* and *I. Kiær*'s investigations into sulphamethylthiazole's inhibition of tuberculous tissue reactions in guinea-pigs the author has examined whether there are other effects of the substance on the animal's powers of resistance. Tests of the effect on the white blood picture, serum proteins, precipitin development, anaphylactic shock, Arthus' phenomenon and omental reticuloendothelial reaction failed to disclose any parallel to *K. A. Jensen* and *Kiær*'s results, though there was an exception in the case of two animals, the Arthus phenomenon having been inhibited during the treatment.

## BIBLIOGRAPHY. .

1. *Bindsløv, G.*: Overfølsomhed og Immunitet ved Tuberkulose. København 1939.
2. *Codounis, A.*: La Protidémie. Paris 1934.
3. *Henriques, V.* og *Klausen, U.*: Biochem. Zeitschr. 254, 414, 1932.
4. *Jensen, K. A.* og *Bindsløv, G.*: Unpublished.
5. *Jensen, K. A.* og *Kiær, I.*: Acta pathol. et microbiol. In press.

## BEOBSACHTUNGEN ÜBER DEN FEINEREN BAU UND DIE FUNKTION DER MENSCHLICHEN ZELLE UNTER NORMALEN UND PATHO- LOGISCHEN VERHÄLTNISSEN.

Von *Ivar Wallgren*.

(Eingegangen bei der Redaktion am 29. April 1943).

Vor ungefähr 100 Jahren wiesen Schleiden und Schwann Zellen im Pflanzen- und Tierkörper nach, nahmen aber an, dass die Zellen durch eine Kondensation der Grundsubstanz der Gewebe entstanden. Einige Jahre später prägte Rudolf Virchow den berühmten Satz: »Omnis cellula e cellula.« Jede Zelle entsteht aus einer anderen Zelle. Seitdem war es klar, dass das innerste Wesen des Lebens an die Zelle gebunden ist, und durch genauere Erforschung des Baues und der Funktion der Zelle hat man den Schleier zu lüften versucht, der immer noch das Meiste von dem Geheimnis der Lebensprozesse verhüllt.

Die Auffassung der feinsten Zellstrukturen ist jedoch keine einheitliche. Hittmair hat die heute herrschenden Ansichten in folgenden vier Gruppen zusammengestellt:

Gruppe 1: Der Zelleib besteht aus einem feinen Netzwerk von Fäserchen, in dessen Lücken das flüssige Paraplasma sich befindet.

Gruppe 2: Das Protoplasma hat einen wabigen Bau, die im Zelleib nachweisbaren Fäden und Körnchen liegen mindestens zum grössten Teil in den Wabenwänden, deren feinere Struktur unbekannt ist.

Gruppe 3: Fäden und Zwischenfadensubstanz erfüllen die Zellen.

Ob die Fäden ein Netzwerk bilden oder sich nur überkreuzen, bleibt dahingestellt.

Gruppe 4: Funktionsträger und Hauptbestandteil der Zelle sind Granula, die durch eine Ausscheidungssubstanz ihrer Körner miteinander verbunden und zugleich getrennt sind.

Im Pathologisch-Anatomischen Institut zu Helsingfors haben sich Axel Wallgren und seine Schüler auch der Zellforschung gewidmet. Die bei uns herrschende Auffassung über den Bau des Protoplasmas schliesst sich am ehesten der Gruppe 1 in Hittmairs Einteilung an. In fixierten und gefärbten weissen Blutkörperchen, in mesenchymalen und epithelialen Gewebszellen sowie in verschiedenen Arten von Tumorzellen haben Wallgren, Castrén, Chydenius, Klossner, Leidenius, Thesleff u. a. ein aus feinen Granula und Fasern aufgebautes Zytoretikulum, ein Raumnetz, das mit dem Mikrozentrum zusammenhängt, nachgewiesen.

Die Chondriosomensubstanz der Zelle ist in diesem Raumnetz lokalisiert. Auch die mit Hilfe der gewöhnlichen Blutfärbungsmethoden sichtbar gemachte Granularsubstanz stellt bei dem Spezialgranulozyten Teile des Netzes dar. Im eosinophilen Granulozyten kann die eosinophile Substanz nach Wallgren (1926) auch in Form eines Netzes auftreten.

Ebenso konnte Axel Wallgren (1923) zeigen, dass das Oxydase-enzym sowohl bei den neutrophilen Granulozyten als in den unreifen Vorstufen der Zelle in der netzförmigen Struktur des Protoplasmas lokalisiert ist, wo es vor allem in den Knoten des Netzes nachgewiesen werden kann.

Als Axel Wallgren (1923) lebende amphophile Leukozyten von Kaninchen nach Detjen-Weidenreichs Agarmethode in Präparaten untersuchte, die auf 38° erwärmt waren, sah er in einer Zelle einen granulafreien Fleck, der von radiär ausstrahlenden Körnchen umgeben war. Wallgren bemerkt hierüber: »In der Hoffnung, möglicherweise eine Erklärung des Phänomens zu finden, musterte ich die Zellen mit erhöhter Aufmerksamkeit durch und gewahrte da, wiewohl undeutlich, zwischen den Granula, wo sie am lichtesten lagen, Fäden, die sie miteinander verbanden.«

Nachdem Wallgren seine Zellen fixiert und mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain gefärbt hatte, kamen Granula zum Vorschein, die sich durch feine Fäden zu einem Netzwerk vereinigten. »Die

Gruppierung der Granula«, sagt Wallgren, »die zuerst meine Aufmerksamkeit gefesselt hatte, stand anscheinend in Zusammenhang mit dem Plasmanetz, von dessen Fäden einige radiär mit dem Mikrozentrum als Mittelpunkt angeordnet waren.« .

Später fand Wallgren auch in lebenden neutrophilen Leukozyten des Menschen »farbloze Granula« und feine Fäden, die die Körner auf dieselbe Weise wie in den amphophilen Blutkörperchen des Kaninchens verbanden.

Als derselbe Forscher Granulozyten in Dunkelfeldbeleuchtung untersuchte, bemerkte er überall im Protoplasma der Zelle leuchtende Körnchen. Er äusserte darüber: »Die »Granula« stehen überall miteinander und mit der Zelloberfläche durch die oft von mir erwähnten »Fäden« in Verbindung, die jetzt viel deutlicher als in den gefärbten Präparaten hervortreten. In der Tat sind diese »Fäden« nichts anderes als die fadenähnlichen, feineren oder gröberen, wechselnden, netzförmig angeordneten Bahnen, auf denen die in den »Granula« gesammelten Substanzen von einer Stelle des Zellleibes zu einer anderen, von der Zellperipherie bis zu den zentralen Teilen der Zelle fliessen.«

Die obigen Äusserungen sind hier ausführlich und in ihrer ursprünglichen Fassung wiedergegeben, weil die bei uns herrschende Auffassung über den Bau und die Funktionen des Protoplasmas auf diesen Beobachtungen Axel Wallgrens über die lebenden weissen Blutkörperchen fusst. Die Ähnlichkeit zwischen den in der fixierten Zelle sichtbar gemachten netzförmigen Strukturen und dem Raumnetz im lebenden weissen Blutkörperchen im Dunkelfeldmikroskop war nach der Ansicht Wallgrens anscheinend so offenkundig, dass er eine nähere Prüfung der Identität der retikulären Systeme nicht als notwendig erachtete.

Aus einer Untersuchung, mit der ich mich seit dem Anfang dieses Jahres beschäftigt habe, geht jedoch hervor, dass im Protoplasma zwei voneinander unterschiedene netzförmige Systeme zu finden sind, die einander hochgradig ähneln. Das eine kann durch geeignete histologische Technik in der gefärbten Zelle sichtbar gemacht werden. Das andere ist hauptsächlich durch die Beobachtungen bekannt, die mit Hilfe des Dunkelfeldmikroskops angestellt worden sind.

Meine eigenen Untersuchungen gründen sich teils auf Feststellungen an lebenden weissen Blutkörperchen, teils auf fixiertes Material aus normalem oder pathologischem menschlichen Gewebe. Die Beobachtungen wurden mit zwei elektrisch erwärmbaren Mikroskopen, teils in Dunkelfeldbeleuchtung und teils bei gewöhnlichem Licht gemacht. Die lebenden weissen Blutkörperchen entstammten entweder einem Tropfen frischen Blutes oder der Plasmasäule bei Senkungsreaktionen, die zu klinischem Zweck ausgeführt wurden. Das untersuchte lebende Material war ungefärbt oder mit Vitalfarben tingiert.

In der Hoffnung, eine für den Zweck geeignete Vitalfarbe zu finden, wurden einige der gewöhnlichsten Farben geprüft. Von den kolloidal löslichen Farben Trypanblau, Lithionkarmin und Kongorot sind im vorliegenden Fall die beiden erstgenannten wegen ihrer Giftigkeit nicht brauchbar. Die molekular löslichen Farben Janusgrün und Neutralrot sind etwas giftig, aber doch verwendbar. Am allerbesten ist Brillantkresylblau, falls die Farbe den Blutkörperchen auf geeignete Weise zugeführt wird. In konzentrierter Form schädigt die Farbe (Fabrikat Hollborn) die lebenden Zellen. Nach Nyfeldt kommt nur Brillantkresylblau (Grübler) in Betracht. Die Präparate anderer Firmen sind toxisch.

Vielleicht ist die Giftigkeit durch Verunreinigungen bedingt. Hierauf deutet ja der Umstand, dass die Farbe in den oben behandelten Versuchen gut von den Granulozyten vertragen wurde, wenn die Zuführung derselben in verdünnter Form erfolgte. Wird die Farbe in 0,85 %iger Kochsalzlösung in der Konzentration 1:10 000 aufgelöst, so nehmen die Blutzellen die blaue Farbe begierig auf, verhalten sich aber annähernd ebenso wie ungeschädigte Zellen und bleiben mehrere Stunden bei 37° am Leben. Es darf vielleicht hinzugefügt werden, dass es demjenigen, der gewöhnt ist, in Nativpräparaten weisse Blutkörperchen bei Dunkelfeldbeleuchtung in geeignet filtrierte Licht zu beobachten, nicht schwer fällt, zu sehen, wann ein weisses Blutkörperchen geschädigt ist und wann es sich normal verhält.

Bei den Versuchen wurden die Präparate durch Mischung eines Tropfen Blutes mit gleichen Teilen Brillantkresylblau 1:10 000 hergestellt. Von der Mischung wurde ein kleiner Tropfen unter ein Deckglas gebracht, das mit geschmolzenem Vaseline umgeben wurde. Die Präparate wurden danach bei 1350—1800facher Vergrößerung durchgemustert.

Wenn ein solches Präparat in Dunkelfeldbeleuchtung betrachtet wurde, war die leuchtende Granularmasse in den neutrophilen Granulozyten ungefärbt. Die Farbtropfen er-



schiene als kleine dunkle Lücken in dem Netzwerk, das von der leuchtenden Substanz gebildet wurde. In gewöhnlichem Licht fanden sich in den neutrophilen Granulozyten zahlreiche blaue Tropfen in dem Protoplasma, das im übrigen ungefärbt war. Auf dieselbe Weise, wie die blasser Spirochäte sichtbar wird, wenn man sie in einem mikroskopischen Präparat mit Tusche umgeben hat, tritt auch in einem weissen Blutkörperchen, das voll blaugefärbter kleiner Tropfen ist, der ungefärbte Teil des Zelleibes als ein die Tropfen umgebendes Netzwerk hervor, und der Bau des ganzen Protoplasmas ist deutlicher zu erkennen als in einem ungefärbten Präparat. Vergleicht man dann zwei ähnliche Zellen und sieht abwechselnd in das Dunkelfeldmikroskop und das gewöhnliche Mikroskop, so wird es einem bald klar, dass die Strukturen in dem Zelleib in gewöhnlichem Licht und in Dunkelfeldbeleuchtung etwas voneinander abweichen. In gewöhnlichem Licht hat man den Eindruck von gleichmässig dicken, ziemlich groben Fäden, die die Farbtropfen umgeben und dadurch ein ungefärbtes Netzwerk bilden. Im Dunkelfeld sieht man überall leuchtende Granula, die durch undeutlich sichtbare feine Fäden verbunden sind.

Die Farbe wird also in Form von Tropfen, die scharf von der Umgebung abgegrenzt sind, in das Protoplasma der Zelle aufgenommen. Noch nach dem Tode verbreitet sich die blaue Farbe nicht von den Tropfen in das angrenzende Protoplasma. Die Art, wie die Zelle die Farbe behandelt, schien mir darauf hinzuweisen, dass diese in präformierten Bildungen in die Zelle aufgenommen wird. Die Tropfen verteilten sich ziemlich gleichmässig über die ganze Zelle. Ihre Grösse wechselte, aber nur innerhalb gewisser Grenzen. Ein Farbtropfen teilte sich oft in zwei kleinere, die dann von dem beweglichen Protoplasma nach verschiedenen Richtungen transportiert wurden. Hierbei entstand zwischen den beiden Tropfen oft ein feiner blaugefärbter Faden, der sich in die Länge zog, bis er schliesslich zerriss. Mitunter wiederholte sich diese Erscheinung unaufhörlich und an mehreren Stellen zugleich. Dadurch kamen in der Zelle netzförmige Strukturen zustande,

die hochgradig an das Zytoretikulum der Histologen erinnern. In einer Zelle traten die blaugefärbten Fäden auf, wenn die Temperatur erniedrigt wurde, und die Bewegungen im Plasma wurden auffallend träge. In vitalgefärbten Granulozyten habe ich einigemal gesehen, dass die blaugefärbten netzförmigen Strukturen bestehen blieben, wenn die Zellen gestorben und das Protoplasma erstarrt war.

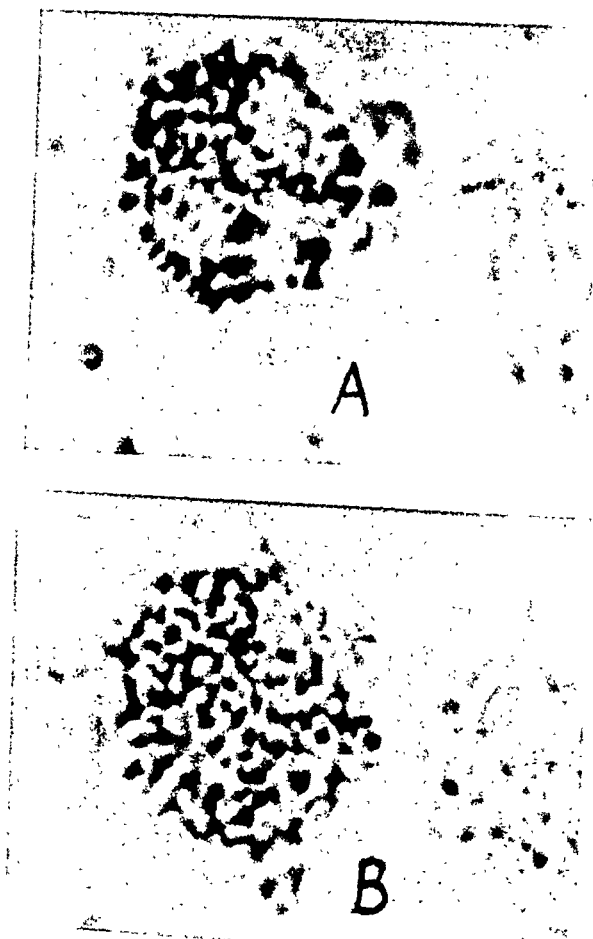
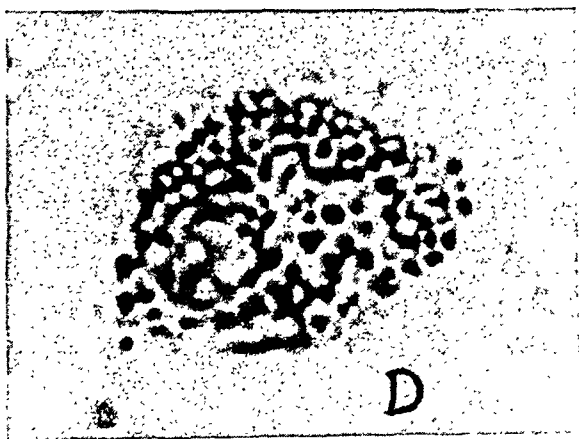
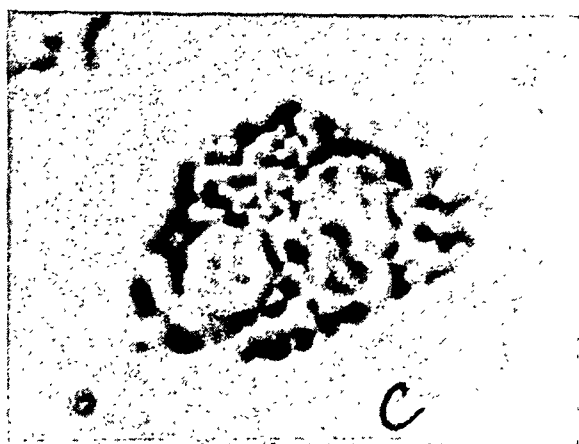


Abbildung 1.

Lebender ungefärbter eosinophiler Granulozyt aus einer Senkungsreaktion, in gewöhnlichem Licht photographiert. Die Bilder in schneller Folge von A bis D aufgenommen. Vergrößerung ca. 5000. Das passiv bewegliche System ist in dem Zelleib in Form schwarzer

Durch einen Zufall prüfte ich ein ungefärbtes Nativpräparat in gewöhnlichem Licht und fand da zu meiner grossen Überraschung, dass die »Farbtropfen« andauernd in den Granulozyten vorhanden waren. Nur die blaue Farbe fehlte. Die Tropfen waren grau oder schwarz und verhielten sich ganz ebenso in der Zelle wie die gefärbten Tropfen. *Es war also*

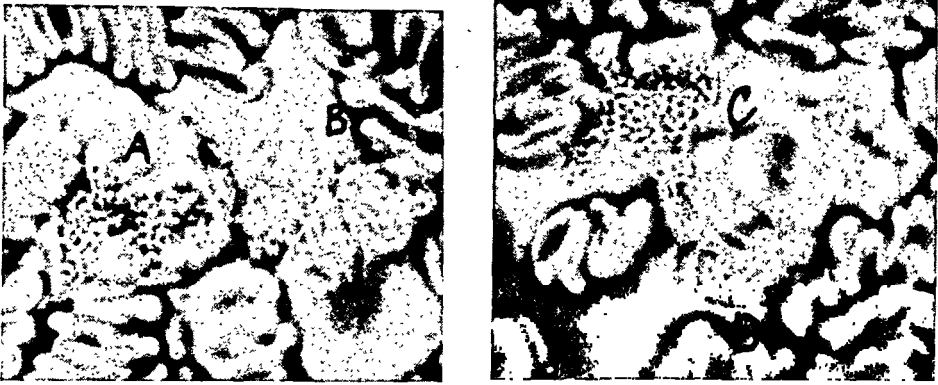


Tropfen zu sehen. Die weissen Tropfen in dem aktiv beweglichen System treten deutlich hervor. In Abbildung C die beiden Zipfel des Kernes. In Abbildung D ist der eine Zipfel in dem Protoplasma verschwunden. Infolge der Anwesenheit von Zitrat in dem umgebenden Plasma bewegten sich die Zellen nicht ganz normal.

*offenbar, dass die Vitalfarbe in präformierten Tropfen in den Zelleib aufgenommen worden war.*

Eine Zellform, die sich besonders gut für Beobachtungen in ungefärbtem Zustand eignet, ist der eosinophile Granulozyt. Die Strukturen im Protoplasma sind bei diesem auffallend grob und die Bewegungen der Zelle gemächlich und träge und daher leicht zu verfolgen. Die Abbildungen 1 und 2 geben Augenblicksbilder von lebenden ungefärbten eosinophilen Zellen wieder. Auf sämtlichen Photographien sieht man im Zelleib zahlreiche schwarze runde oder etwas unregelmässig geformte Tropfen, denen in der fixierten, nach May-Grünwald gefärbten Zelle in Abbildung 3 die eosinophilen Granula entsprechen. Das Protoplasma um die schwarzen Tropfen in den lebenden Zellen bildet ein Netzwerk, in dem man eine graue Grundsubstanz und in dieser zahlreiche runde oder ausgezogene weisse Körnchen unterscheiden kann. In der gefärbten Zelle (Abbildung 3) sieht das netzförmig angeordnete Plasma homogen aus. In der Zelle 1 D liegen die schwarzen Tropfen weniger dicht im mittleren Teil der Zelle, und das Protoplasmanetz ist infolgedessen hier gröber und unregelmässiger als in den peripheren Partien der Zelle, wo die eosinophilen Granula dicht placiert sind.

Die graue und die weisse Substanz bilden zusammen das aktiv bewegliche System im Protoplasma. Auch wenn die Zelle keine amöboiden Bewegungen ausführt, sieht man in dem Protoplasmanetz Strömungen. Teile des Netzes fliessen z. B. nach rechts, andere nach links, oder das Protoplasmanetz verschiebt sich von der Peripherie nach dem Zentrum hin oder umgekehrt. Bei allen diesen Bewegungen verhalten sich die dunklen Tropfen völlig passiv. Sie werden in der Zelle von dem aktiv beweglichen System hin und her transportiert. Hierbei verändert sich ihre runde Form. Die Tropfen ziehen sich in die Länge oder werden von dem umgebenden aktiv beweglichen Plasma zusammengedrückt. Es herrscht eine intensive Wechselwirkung zwischen der weissen Substanz in dem aktiv beweglichen System und den Tropfen des passiv beweglichen Systems. Oft sieht man, wie ein schwarzer Tropfen auf seinem



*Abbildung 2.*

Ungefärbte Granulozyten in Blut, in gewöhnlichem Licht photographiert, während sie normale amöboide Bewegungen ausführten. Expositionsdauer 1/10 Sekunde, Vergrößerung ca. 2500. Die eosinophilen Granulozyten A und C treten durch ihre deutliche Struktur hervor. In der Mitte der Zelle A einige schwarze Tropfen zu Stäbchen ausgezogen. B und D sind neutrophile Granulozyten, die Struktur ist nur stellenweise sichtbar.



*Abbildung 3.*

Eosinophiler Granulozyt in einem gefärbten Blutpräparat, Vergrößerung ca. 5000.

Weg gegen die weisse Substanz stösst. Er teilt sich dann in zwei Tropfen, die nach verschiedenen Richtungen geführt werden. Bisweilen dringt die weisse Substanz in einen schwarzen Tropfen ein. Einige Sekunden ist das Bild unverändert, aber dann teilt sich der Tropfen in zwei Hälften, und die

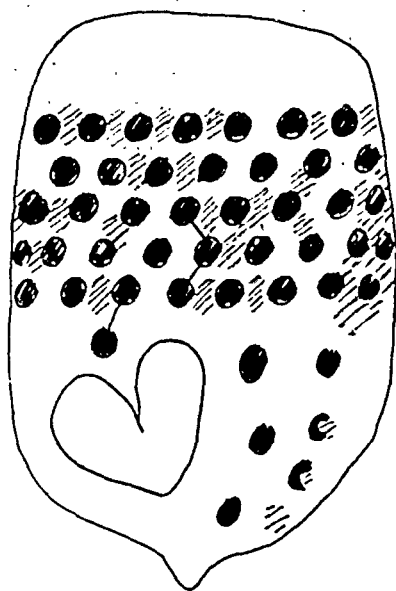


Abbildung 4.

Schema des Granulozyten. Die passiv beweglichen Tropfen schwarz, das aktiv bewegliche System ungefärbt, die weissen Tropfen in dem aktiv beweglichen System gestrichelt.

schwarze Substanz bildet den früher beschriebenen feinen Faden zwischen den beiden neuen Tropfen.

In Abbildung 4 ist ein Schema eines eosinophilen Granulozyten gegeben. Die schwarzen gefüllten Ringe entsprechen den passiv beweglichen Tropfen in der Zelle. Dadurch, dass die Tropfen in einem gewissen Abstand voneinander liegen, bildet das Zellplasma um sie herum eine in der Abbildung ungefärbte netzförmige Struktur. Im unteren Teil der Zelle, wo die Tropfen in grösserem Abstand voneinander auftreten, macht das Plasma nicht mehr den Eindruck eines Netzes. Im obersten Teil der Zelle befindet sich die optisch leere Pseudo-

podie, in die das ungefärbte Netz übergeht. Schwarze Punkte in der obersten Reihe können sich z. B. nach rechts verschieben, während die entsprechenden Teile der nächstobersten Reihe gleichzeitig nach links geführt werden, ohne dass dadurch ein Auseinanderfall des aktiv beweglichen Systems erfolgt. Die gestrichelten Körper in dem Schema geben die auf den Photographien sichtbaren weissen Tropfen in der aktiv beweglichen Substanz an. Diese weisse fließende Masse verteilt sich in dem Zelleib ziemlich gleichmässig. In der lebenden Zelle sieht man, wie die weissen Tropfen oft mit einem Ruck ineinander überfließen. Sie treten einzeln auf oder bilden an Stellen, wo die Tropfen zusammengefloßen sind, Teile des aktiv beweglichen Netzes und umschliessen dann einen oder mehrere der passiv beweglichen Tropfen.

Im unteren Teil des Schemas sieht man, wie schwarze und gestrichelte Körper paarweise auftreten. Dies ist ein Phänomen, das in der lebenden Zelle oft vorkommt. Die Paare können in der Zelle von der beweglichen grauen Substanz weithin transportiert werden. Auch in der toten Zelle sieht man, wie ein vitalgefärbter Tropfen, der dem passiv beweglichen System angehört, innig mit einem Tropfen aus dem aktiv beweglichen System vereinigt ist. Wenn man einen lebenden Granulozyten auf dem Wärmetisch in gewöhnlicher Beleuchtung beobachtet, findet man nicht selten, dass ein solches Paar, das sich von der in Bewegung befindlichen Zelle losgemacht hat, in lebhaftem Brown-Tanz frei in dem umgebenden Serum herumwirbelt. Noch in toten, in der Auflösung begriffenen Zellen sieht man, dass die Paare zusammenhalten. Im Protoplasma der lebenden Zelle löst sich dagegen ein Granulum wieder leicht von seinem Partner.

Im neutrophilen Granulozyten ist der Zelleib nach denselben Prinzipien gebaut. Die Tropfen in dem passiv beweglichen System sind bedeutend kleiner als im eosinophilen Granulozyten. Hierdurch wird auch das aktiv bewegliche Netz feiner. Die weissen Granula in dem aktiv beweglichen System sind klein und finden sich gleichmässig in der Zelle verteilt. In neutrophilen Granulozyten, die mit Brillantkresylblau vital-

gefärbt sind und bei 37° untersucht werden, treten nach längerer Zeit blaugefärbte Vakuolen auf, die weniger lichtbrechend als die normalen passiv beweglichen Tropfen der Zelle sind und augenscheinlich zum grössten Teil aus Wasser bestehen. Diese Tropfen oder Vakuolen werden auch von der aktiv beweglichen Substanz im Zelleib herumtransportiert.

In einem neutrophilen Granulozyten, der in Dunkelfeldbeleuchtung betrachtet wird, sind hauptsächlich die weissen Tropfen in dem aktiv beweglichen System zu sehen, wohingegen das passiv bewegliche System dunkel ist. In einem eosinophilen Granulozyten leuchten die passiv beweglichen Tropfen, während die weissen Tropfen in dem aktiv beweglichen System nicht so deutlich im Dunkelfeld hervortreten.

Der Monozyt hat ein sehr feines aktiv bewegliches Netz, das sich über das ganze Plasma verteilt. Im Lymphozyten sind das aktiv und das passiv bewegliche System nicht gleichmässig in der Zelle verteilt, sondern sammeln sich, wenn die Zelle erwärmt wird, vor allem am Hilus des nierenförmigen Kernes. Die ziemlich grossen passiv beweglichen Tropfen werden hier von dem aktiv beweglichen System auf dieselbe Weise wie im Granulozyten behandelt. Oft sieht man zwischen den passiv beweglichen Tropfen Fäden entstehen.

Im lebenden Granulozyten ist das passiv bewegliche System vitalfärbbar. Es liegt nahe, anzunehmen, dass auch die Substanzen, die in der getöteten fixierten Zelle Farbe aufnehmen, demselben System angehören. Dank dem Entgegenkommen Professor F. Saltzmans konnte ich aus dem hämatologischen Laboratorium des Mariakrankenhauses für den Zweck geeignete Blutpräparate erhalten. Ein Fall von Pneumonie lieferte neutrophile Leukozyten, die mit abnorm grossen neutrophilen Granula versehen waren. Als die Zellen mit May-Grünwalds Farblösung gefärbt worden waren, wurden sie in Dunkelfeldbeleuchtung beobachtet. Es ist technisch möglich, weisse Blutkörperchen in gewöhnlich gefärbten Strichpräparaten in Dunkelfeldbeleuchtung zu verfolgen. In einem neutrophilen Granulozyten sind die weissen Tropfen in dem aktiv beweglichen System als schwach grünliche leuchtende Körnchen zu



sehen. Zwischen den leuchtenden Körnchen zeigten sich jetzt die neutrophilen gefärbten Granula als dunkle, deutlich erkennbare Schatten. Das Mikroskop wurde mit einem Wechselkondensor (Zeiss) versehen, der es ermöglicht, dass das Präparat, ohne von seinem Platz gerückt zu werden, abwechselnd in Dunkelfeldbeleuchtung und gewöhnlichem Licht untersucht

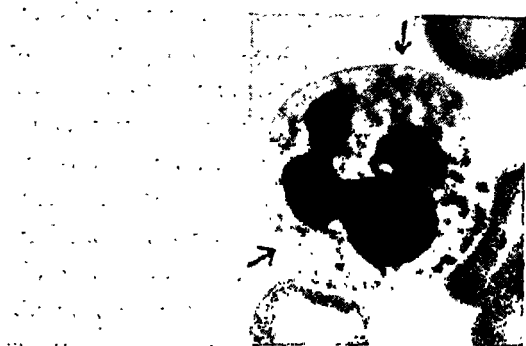


Abbildung 5.

Neutrophiler Granulozyt in einem gefärbten Blutpräparat (Zeiss' Apochromat 90, Kompensationsokular 18). Die neutrophilen Granula dunkel. Die Pfeile geben weisse Tropfen in dem aktiv beweglichen System an.

wird. Auch jetzt ergab es sich bei der Untersuchung deutlich, dass die neutrophilen Granula nicht mit den leuchtenden Granula im Dunkelfeld zusammenfielen, sondern zwischen ihnen lagen. Als ich hiernach gefärbte neutrophile Granulozyten aufmerksam in gewöhnlichem Licht beobachtete (Zeiss' Apochromat 90, Okular 20), erkannte ich Teile des aktiv beweglichen Systems bei den grossen neutrophilen Granula in Form ungefärbter heller Körnchen (Abbildung 5). In einem grossen Lymphozyten (Abbildung 6) war in einem gewöhnlich gefärbten Blutpräparat die im Dunkelfeld leuchtende weisse Substanz des aktiv beweglichen Systems neben den gefärbten Granula zu sehen. Auch basophile Granula in basophilen Granulozyten gehören dem passiv beweglichen System an.

Um das Oxydaseenzym in der Zelle zu lokalisieren, wurden neutrophile Granulozyten mit einer verdünnten Lösung

von Dimethylparaphenyldiamin behandelt. Hierbei erhielt man zahlreiche blaue Körnchen im Protoplasma der Zelle. Auch diese Körnchen lagen zwischen der leuchtenden Granularsubstanz im Dunkelfeld und waren in den Maschen des aktiv beweglichen Systems in gewöhnlichem Licht deutlich zu er-



Abbildung 6.

A grosser Lymphozyt in einem gefärbten Blutpräparat, B dieselbe Zelle in Dunkelfeldbeleuchtung. Die weisse Substanz in dem aktiv beweglichen System deutlich um die gefärbten Granula in Abbildung A sichtbar. In Abbildung B tritt die weisse Substanz in Form weisser Granula in dem schwarzen Zelleib hervor.

kennen. Die Oxydase ist also im Zelleib in das passiv bewegliche System lokalisiert.

Ebenso verhalten sich auch die mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain färbbaren Strukturen in fixierten Zellen, was zu der Vermutung führt, dass auch das Chondriosom dem passiv beweglichen System angehört.

Diese Annahme wird bestätigt, wenn man vitalgefärbte Lymphozyten näher untersucht. In lebenden Zellen, die mit Janusgrün oder Brillantkresylblau gefärbt sind, sieht man am Hilus des nierenförmigen Kernes ziemlich grosse grüne bzw. blaue Tropfen und um diese herum etwas grössere ungefärbte, in Dunkelfeldbeleuchtung leuchtende Granula, die miteinander zusammenhängen und ein Netzwerk bilden. Die unge-

färbten Tropfen bewegen sich aktiv, die gefärbten passiv. Die letzteren sind oft durch feine gefärbte Fäden verbunden. Nach M. R. und W. H. Lewis färbt sich die Chondriosomensubstanz in vitalgefärbten Lymphozyten mit Janusgrün. Alles scheint mir mithin darauf hinzuweisen, dass dem Chondriosom, das in Lymphozyten in fixierten, mit Eisenhämatoxylin gefärbten Präparaten zum Vorschein kommt, in der lebenden Zelle die passiv beweglichen, leicht vitalfärbbaren Tropfen entsprechen, die daher im Lymphozyten zum wesentlichen Teil von Chondriosomensubstanz gebildet werden. Auch die Ähnlichkeit zwischen dem passiv beweglichen System und den mit Eisenhämatoxylin färbbaren Strukturen ist schlagend. In beiden sieht man eine Anzahl ziemlich grosser Punkte und zwischen ihnen hinlaufender gerader Striche. Das aktiv bewegliche System, das von Axel Wallgren (1928) als Chondriosomensubstanz aufgefasst worden war, hat nicht genau dasselbe Aussehen und färbt sich in dem lebenden Lymphozyten auch nicht mit Janusgrün.

Nach mehreren französischen Forschern besteht das Chondriosom aus lipoidartigen Stoffen, die nach Regaud mit einem Eiweisstoff verbunden sind. Französischerseits ist auch hervorgehoben worden, dass Heilmittel, Gifte und Toxine von der Chondriosomensubstanz gebunden werden können.

Bei meinen Versuchen mit Brillantkresylblau fiel mir die Schnelligkeit und Begierde auf, mit der die Farbe in das weisse Blutkörperchen aufgenommen wird. Man braucht nur einige Minuten, um einen Tropfen Blut und Farblösung zu mischen und daraus ein Präparat herzustellen. Wenn das Präparat fertig war und in das Mikroskop eingesetzt wurde, hatten die Leukozyten schon Farbe aufgenommen. Als die Farblösung bei dem folgenden Versuch sukzessiv verdünnt wurde, verloren die lebenden Zellen nicht in nennenswertem Grade die Fähigkeit, die blaue Farbe aufzunehmen. Die Verdünnung 1 : 100 Millionen färbte noch neutrophile Granulozyten, wenn auch langsamer als gewöhnlich. Erst wenn die Konzentration 1 : 2 Milliarden erreicht war, nahmen die Zellen einen schwach grünlichen Farbenton an. *Die Grenze für die Fähigkeit der*

*Zelle, Farbe aus dem umgebenden Medium aufzunehmen, schien also bei etwa 1 : 1 Milliarde zu liegen. Vielleicht darf diese Eigenschaft der Leukozyten mit der ebenerwähnten Fähigkeit des Chondriosoms, körperfremde Stoffe in sich aufzunehmen, in Verbindung gebracht werden.*

In tote Granulozyten wird die Farbe jedoch nicht gleich leicht aufgenommen. Es wurden Versuche gemacht mit Granulozyten, die bei einer 48 Stunden alten Senkungsreaktion entnommen, in der alle Zellen tot waren. Aus einer Verdünnung von 1 : 10 000 nahmen die Zellen zwar Brillantkresylblau auf, aber anders als lebende Zellen. Nur einer oder der andere passive Tropfen war schwach gefärbt. Die Zellen färbten sich auch nicht so schnell wie lebende Zellen.

Wie aus dem Obigen hervorgeht, dürfen wir mit guten Gründen annehmen, dass die Chondriosomensubstanz einen Teil des passiv beweglichen Systems bildet und sich folglich wie eine Flüssigkeit verhält, also flüssige Konsistenz besitzt. Die Histologen haben gezeigt, dass die Chondriosomen in Zellen gleicher Art rund oder zu langen Stäben ausgezogen sein können. Die folgende Beobachtung erklärt vielleicht, wieso ein und dieselbe Substanz in der Zelle unter so stark variierender Form auftreten kann. Ein vitalgefärbter eosinophiler Granulozyt kroch langsam auf dem Objektglas vorwärts. Im hinteren Teil der Zelle war ein grosser blaugefärbter Tropfen zu sehen. Die Zelle war etwas beschädigt und heftete sich daher mit ihrem hinteren Teil an der Unterlage an. Sie strebte jedoch vorwärts, wobei sich der hintere Teil der Zelle sichtbar straffte. Der blaue Tropfen wurde dabei zu einem langen schmalen Stab ausgezogen, der wieder runde Form annahm, als die Zelle sich zusammenzog. Vielleicht entstehen die stab- oder fadenförmigen Chondriosomen in Gewebszellen durch ähnliche Spannungsverhältnisse im umgebenden Protoplasma.

*Das Fazit der vorstehenden Ausführungen ist also, dass zu dem passiv beweglichen System in den untersuchten Zellen Chondriosomensubstanz, die für die eosinophilen, neutrophilen und basophilen Granulozyten charakteristischen Granularsubstanzen und Oxydaseenzym gehören. Wie sich diese ver-*

schiedenen Stoffe gegenseitig zueinander verhalten, entzieht sich der Beobachtung. In einem neutrophilen lebenden ungefärbten Granulozyten sind die passiv beweglichen Tropfen hinsichtlich der Grösse und Farbe etwas variabel. Manche scheinen schwarz, andere grau zu sein. Brillantkresylblau wird auch nicht von allen Tropfen aufgenommen. Vielleicht deutet dies darauf, dass die verschiedenen Substanzen in dem passiven System sich voneinander getrennt halten.

Bei seinen Untersuchungen der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten in Dunkelfeldbeleuchtung beobachtete Axel Wallgren im Protoplasma der Zelle ein interessantes Phänomen, das er »Tropfenverschiebung« nannte. Sowohl in neutrophilen als in eosinophilen Granulozyten sah er, wie sich die leuchtenden Granula über weitere oder kürzere Strecken nach dem Mikrozentrum der Zelle hin verschoben. Wenn der Tropfen sein Ziel erreicht hatte, wurde er oft mit einem Ruck zurückgestossen. Auch in vitalgefärbten Präparaten war es mir gelungen, das Phänomen in gewöhnlichem Licht zu beobachten. In einer eosinophilen Zelle sah ich, wie ein dem passiv beweglichen System angehörender Tropfen von dem aktiv beweglichen umgebenden Protoplasmanetz nach dem Mikrozentrum hin geführt wurde. Als der Tropfen die granulafreie graue Lücke der Zelle, die das Mikrozentrum bezeichnete, erreicht hatte, wurde er mit einem Ruck zurückgezogen. In einer Zelle verschoben sich mehrere ähnliche Tropfen in einer Reihe nacheinander auf diese Weise gegen das Mikrozentrum der Zelle. Auch konstatierte ich, wie die hellen Tropfen in der aktiv beweglichen grauen Substanz bei gewöhnlicher Beleuchtung weit nach dem Mikrozentrum hin wanderten. Es entsteht jedoch keine Anhäufung von Substanz in der Mitte der Zelle, sondern die Tropfen verschwinden wieder in der Umgebung. Unwillkürlich denkt man an einen chemischen Prozess, der schnell bei dem Mikrozentrum der Zelle stattfindet. *Es dürfte auch von Interesse sein, dass die passiv beweglichen Tropfen und die weissen Tropfen des aktiv beweglichen Protoplasmas, zwischen denen überall im Zelleib eine*

lebhaft<sup>e</sup> Wechselwirkung festzustellen ist, oft demselben Ziel, dem Mikrozentrum der Zelle, zugeführt werden.

Aus den Beobachtungen, über die hier berichtet worden ist, geht hervor, dass das aktiv bewegliche System das Transportwesen der Zelle darstellt, das die verschiedenen Teile des Zelleibes mit den für die Lebenshaltung der Zelle wichtigen, in den passiv beweglichen Tropfen enthaltenen Stoffen versieht.

Auch die Fortbewegung der Zelle, die amöboiden Bewegungen, werden von der grauen Substanz des aktiv beweglichen Systems besorgt. Aus Abbildung 1 D sieht man, wie die aktiv bewegliche graue Substanz ohne Grenze in die strukturlose Pseudopodie, die die Zelle teilweise umgibt, übergeht. Wenn die Zelle vorwärts kriecht, leitet eine solche Pseudopodie stets die Bewegungen der Zelle ein. Nach einer Weile fließen die passiv beweglichen Tropfen und die weissen Tropfen in dem aktiv beweglichen System plötzlich in die optisch leere Pseudopodie. Dabei schwillt das zunächst bei der Pseudopodie gelegene graue aktiv bewegliche Netzwerk zu einer zitternden, ziemlich lockeren gallertartigen Masse an. Die passiv beweglichen Tropfen in den Maschen des Netzes und die weissen Tropfen in den angeschwollenen Fasern dieses gelatinösen Netzes führen hierbei in dem neutrophilen Granulozyten sehr lebhaft<sup>e</sup> Brown-Bewegungen aus. In der eosinophilen Zelle ist dieser Brown-Tanz nur angedeutet. Nach einigen Augenblicken nimmt das graue, aktiv bewegliche Netz wieder seine gewöhnliche Konsistenz und sein gewöhnliches Aussehen an, und die Brown-Bewegungen in den Tropfen hören auf. Es scheint mithin wahrscheinlich, dass die strukturlose Pseudopodie, wenn sie verschwindet, in die angrenzende graue Substanz in dem aktiv beweglichen Plasma aufgenommen wird, welches dabei anschwillt. Es liegt dann auch die Annahme nahe, dass dieselbe Substanz auch zur Entstehung der Pseudopodie führt.

Oben wurden die beiden verschiedenen Systeme im Zelleib, das aktiv und das passiv bewegliche, beschrieben. In den eosinophilen und neutrophilen Granulozyten und im Monozyten ist die Anordnung der Systeme in hohem Grade die gleiche.

Im Lymphozyten erkennt man dieselben leitenden Prinzipien im Bau des Protoplasmas, obwohl sich alle Granularmasse zeitweise am Kern ansammelt und ausserdem in geringerer Menge als in den Granulozyten vorhanden ist. Es dünkt mich daher wahrscheinlich, dass auch andere menschliche Zellen nach denselben Prinzipien aufgebaut seien. Zunächst würden Zellen in Betracht kommen, die man bei der Knochenmarkspunktion erhält. Legt man ein gewöhnliches, ziemlich schwach gefärbtes Strichpräparat aus Knochenmark in das Dunkelfeldmikroskop, so sieht man, wie alle Vorstufen der weissen Blutkörperchen voller leuchtender Granula sind. Unter Anwendung der Mikrometerschraube kann man sich im Mikroskop davon überzeugen, dass diese ein Netzwerk bilden, das hochgradig an das aktiv bewegliche System in den lebenden Granulozyten erinnert.

Ein besonderes Interesse bietet die Plasmazelle dar. Der bei dem Kern liegende »helle Hof« ist früher Gegenstand der Aufmerksamkeit gewesen. Aus den Untersuchungen von Axel Wallgren (1911) und Castrén (1919) geht hervor, dass es sich nicht, wie vorher angenommen wurde, um eine Vakuole im Plasma handelt, da sich das Mikrozentrum der Zelle und der nach Silberimprägnierung hervortretende Apparato reticolare interno an der entsprechenden Stelle der Zelle befinden. Im Dunkelfeld sieht man, wie grosse Mengen weisser Tropfen oder Körnchen desselben Aussehens wie die weissen Tropfen in der aktiv beweglichen Substanz der Zelle gerade an dem Platz des hellen Hofes angesammelt sind. *Die in Rede stehende Substanz ist nicht mit den bei Zellfärbungen gebräuchlichen Farben färbbar, und das entsprechende Gebiet im Zelleib der Plasmazelle tritt daher als ein heller Fleck hervor.*

Bisher sind nur Zellen aus Blut oder Knochenmark besprochen worden. Da das aktiv und das passiv bewegliche System in allen untersuchten Zellen wiederzufinden sind, schien es wahrscheinlich, dass es sich um eine innere Organisation im Plasma der Zellen handle und dass diese Anordnung in allen Zellen des Körpers wiederkehre. Es ist daher von gros-

sem Interesse, zu wissen, wie sich die fixen Gewebszellen in dieser Beziehung verhalten. Da mir ein bei Operationen zurückbehaltenes, in Zenkers Lösung fixiertes und mit Eisenhämatoxylin gefärbtes Material zur Verfügung stand, wurden geeignete Partien in besonders dünnen Schnitten einer näheren Prüfung im Dunkelfeldmikroskop unterworfen.

Auf diese Weise wurden Epithelzellen aus Niere, Testis und Epididymis sowie Riesenzellen und Epitheloidzellen aus tuberkulösem Gewebe untersucht. Ausserdem wurden in Formalin fixierte und mit Weigerts Hämatoxylin gefärbte Zellen aus Basalzellenkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen, retikuläre Zellen und Epithelzellen aus Schleimhaut des Corpus uteri sowie Retikelzellen in Lymphdrüse aus einem Fall von Lymphogranulomatose geprüft. Der Befund war immer sowohl in normalem als in pathologischem Gewebe derselbe. Im Zelleib sieht man ein ausgedehntes Netzwerk, das in hohem Grade an das aktiv bewegliche System in den Granulozyten erinnert, aber viel feiner ist. Die im Zellplasma der Zellen vorkommenden gefärbten Strukturen sind in den Maschen des Netzes auf dieselbe Weise wiederzufinden wie das passiv bewegliche System in den Lymphozyten.

*Dieser Sachverhalt scheint mir darauf hinzuweisen, dass die menschlichen Zellen nach dem gleichen System aufgebaut sind. Falls aber die feineren Strukturen im Zellplasma stets denselben Typus vertreten, ist es auch denkbar, dass das innere Leben der Zelle auf ähnliche Weise wie in dem weissen Blutkörperchen vor sich geht. Es muss jedoch weiterer wissenschaftlicher Forschung vorbehalten bleiben, zu entscheiden, ob sich die hier ausgesprochenen Vermutungen bewahrheiten.*

Das aktiv bewegliche System, besonders die weissen Tropfen in demselben, haben sich wegen mangelhafter Färbbarkeit der Aufmerksamkeit entzogen. Mit den bei der gewöhnlichen zytologischen Forschung angewandten Färbemethoden färben sich die Tropfen nicht. 1899 gelang es Zollikofer mittels Joddämpfen in neutrophilen Leukozyten intensiv braune jodophile Körnchen zum Vorschein zu bringen. Laza-



rus und Naegeli nehmen an, dass die Körnchen chemisch mit Amyloid verwandt sind und dass sie sehr schnell zerfallen. Die weissen Tropfen in dem aktiv beweglichen System, um die es sich anscheinend handelt, haben jedoch keine Neigung zu zerfallen. Sie bleiben im Gegenteil noch lange nach dem Tod der Zelle morphologisch unverändert. Auch in Zellen, die in stark sauren Flüssigkeiten fixiert worden sind, sind die ebengenannten Tropfen noch im Protoplasma anzutreffen. Es wurde früher erwähnt, dass die weissen Tropfen in dem aktiv beweglichen System in den Leukozyten in einem auf gewöhnliche Weise gefärbten Blutpräparat zu sehen sind, wenn nur die Aufmerksamkeit darauf gerichtet worden ist. Ein erfahrener Hämatolog, dem die hier wiedergegebenen Untersuchungsergebnisse vorgelegt worden waren, teilte mit, er habe die Tropfen allerdings früher bemerkt, habe sie aber als Lücken im Plasma aufgefasst.

Die passiv bewegliche Substanz ist färbbar und daher den Hämatologen und Histologen allgemein bekannt. *Die Annahme Axel Wallgrens, dass die »Granula« der Granulozyten und die Chondriosomen in der lebenden Zelle in flüssiger Form auftreten, wird, wie schon bemerkt, durch meine Untersuchungen bestätigt. Die Lehre von den Fliessbahnen, die die Granula miteinander verbinden und dadurch ein »Zytoretikulum« bilden, kann dagegen nicht mehr aufrechterhalten werden.* Es ist nicht möglich, dass ein feines und dichtes Raumnetz aus Substanzen, die passiv in der Zelle hin und her transportiert werden, sich fortwährend teilen und nach verschiedenen Richtungen hin verteilt werden, sich, wenn die Zelle bei der Fixierung getötet wird, in wohlgeordnetem, völlig unbeschädigtem Zustand präsentieren würde. Ein gewöhnliches Fischnetz verwickelt sich leicht, wenn es von unerfahrenen Händen behandelt wird. Ein Raumnetz, mit Dimensionen in den drei Ebenen des Raumes, ist natürlich noch schwerer zu regieren, ohne dass es in Unordnung gerät. Das Zytoretikulum der fixierten Zelle, nach dem man ja in seinen Präparaten lange suchen muss, entsteht wahrscheinlich in der einen oder anderen Zelle, kurz bevor die Zelle fixiert wird. Es ist früher

beschrieben worden, wie die aktiv bewegliche Substanz in den Granulozyten periodenweise eine auffallend lebhaftere innere Aktivität bekundet, wobei sich die passiv beweglichen Tropfen unaufhörlich in neue Tropfen teilen. Die Fäden, die sich dabei zwischen den neuen Tropfen bilden, lassen alsdann vermutlich die sogenannten »Fließbahnen« entstehen, und eine Zelle mit mehreren Fäden solcher Art scheint mit einem Zytoretikulum versehen zu sein. Es würde sich mithin nicht um reine Kunstprodukte handeln, sondern um agonal entstandene Strukturen, denen eine unrichtige Bedeutung zugeschrieben worden ist.

#### SCHRIFTTUM.

- Castrén, H.*: Finska Läk. sällsk. Hdl. 61, 489 (1919).  
 — Arb. path. Inst. Helsingfors. N. F. 3 (1923).  
 — Arb. path. Inst. Helsingfors. N. F. 4 (1926).  
*Chydenius, J. J.*: Arb. path. Inst. N. F. 4, 3/4 (1926).  
*Hittmair, A.*: in Hirschfeld, H. und Hittmair, A. Handbuch der allgemeinen Hämatologie, Bd. 1/2. Berlin und Wien 1933.  
*Klössner, A. R.*: Arb. path. Inst., Helsingfors. N. F. 6 (1930).  
*Lazarus, A. und Naegeli, O.*: in Die Anaemie von Ehrlich, P. und Lazarus, A. 1. Abteil. 1. Teil. Wien und Leipzig 1909.  
*Leidenius, L.*: Arb. path. Inst. Helsingfors. N. F. 3 (1928).  
*Lewis, M. R. und W. H.*: Americ. Journ. of Anat. 17 (1915). Zit. nach Wallgren.  
*Nyfeldt, A.*: Acta med. scand. 66, Fasc. 3 (1927).  
*Regaud, Cl. C. R.*: Soc. Biol. T. 65. Zit. nach Eklöv.  
*Thesleff, C.*: Arb. path. Inst. N. F. 7 (1933).  
*Wallgren, A.*: Zieglers Beiträge. 5, 1, (1911).  
 — Arb. path. Inst. Helsingfors. N. F. 4, 227 (1926).  
 — Arb. path. Inst. Helsingfors. N. F. 5, 317 (1928).  
*Zollikofer*: Die Jodreaktion des Blutes. Bern 1899. Zit. nach Lazarus und Naegeli.

## ÜBER EINIGE NEKROBIOTISCHE ERSCHEINUNGEN BEI DEN NEUTROPHILEN UND EOSINOPHILEN GRANULOZYTEN

Von Ivar Wallgren.

(Eingegangen bei der Redaktion 28. Mai 1943).

Im Jahre 1925 berichtet *R. Seyderhelm* über eine Untersuchung bei der er mit kolloidalen Farbstoffen die Vitalität von Entzündungszellen geprüft hat. »Fügt man z. B.«, sagt *Seyderhelm*, »frisch gewonnenem Eiter kolloidale Farblösungen hinzu, so färben sich die meisten Zellen nicht, während überraschenderweise einige Zellen sofort intensiv gefärbt erscheinen. Lässt man diesen Eiter längere Zeit stehen, so nimmt jetzt die Zahl der Leukozyten, die den hinzugefügten kolloidalen Farbstoff in sich aufnehmen, zu, und nach etlichen Stunden sind sämtliche Zellen dieses Eiters färbbar. In diesem Vorgang spiegelt sich färberisch der Prozess des Alterns bzw. Absterbens der Zellen wider. Ausschliesslich die Zelle, deren Membran während des Absterbens ihre Undurchgänglichkeit eingebüsst hat, nimmt den kolloidalen Farbstoff in Protoplasma und Kern auf. Zellen, die völlig »abgestorben« sind, färben sich momentan nach Zusatz eines Tropfens kolloidaler Farbstofflösung; Zellen, die geschädigt sind, lassen den kolloidalen Farbstoff in mehr oder minder verlangsamtem Tempo durch ihre »geschädigte« Membran hindurchtreten.

Die membranschädigende Wirkung jeglicher Art von Zellgiften lässt sich auf diese Weise quantitativ unter dem Mikroskop sichtbar verfolgen: der definitive Zelltod markiert

sich mit dem Zeitpunkt, wo auch der Zellkern den kolloidalen Farbstoff aufgenommen hat.«

Die Farblösung, die *Seyderhelm* anwendet, ist eine Mischung von Kongorot und Trypanblau. Für den klinischen Gebrauch wird die Flüssigkeit in geeigneter Verpackung von der Firma Passet und Wolff in Hamburg geliefert. *Seyderhelms* Methode hat sich als anwendbar erwiesen. *Molnar* hat die Supravitalfärbung bei der Behandlung von Peritonitiden benutzt. Wenn das Exsudat wenig und nichtfärbbare Zellen enthielt, fand er Drainage unnötig. Zellenreiches Exsudat mit zahlreichen färbbaren Zellen lässt vermuten, dass die Infektion weiter fortgeschritten ist und eine Drainage notwendig macht.

*Kemény* hat die Methode bei chirurgischen Krankheiten in den Harnwegen angewandt. Reichliches Vorhandensein supravital färbbarer Zellen deutet auf Chronizität oder Komplikationen. *Köhler* und *Rosenstein* beurteilen den Effekt der Chemotherapie mit Hilfe der *Seyderhelmschen* Methode.

Obwohl es sich also gezeigt hat, dass das Verfahren praktische Bedeutung besitzt, können doch gegen seine theoretische Erklärung gewisse Bedenken erhoben werden. Warum färbt sich nur ein Teil der Zellen des Exsudates? *Seyderhelm* meint, wie bereits hervorgehoben wurde, dass die Membran der lebenden Eiterzellen nicht für Farben in kolloidaler Lösung durchgänglich sei. Erst wenn die Zelle geschädigt oder abgetötet sei, werde die Farbe aufgenommen. Untersucht man jedoch die wichtigsten Eiterzellen, die Granulozyten, in lebendem, ungeschädigtem Zustand in Dunkelfeldbeleuchtung oder in gewöhnlichem Licht, so findet man, dass die Zellen nicht mit einer Membran umgeben sind. *Seyderhelms* Erklärung des Phänomens baut mithin auf unrichtigen Prämissen.

Die Beobachtungen, die *Seyderhelm* gemacht hat, sind indessen unstreitig von Interesse. Man fragt sich, ob es wirklich möglich ist, mittels einer einfachen Farbreaktion zwischen lebender und toter Materie zu unterscheiden. Können kolloidale Farblösungen faktisch als Reagens für das unerforschte Etwas dienen, welches das Leben kennzeichnet?

Es hat mir daher der Mühe wert geschienen, das Verhalten der Granulozyten gegenüber den von *Seyderhelm* angewandten kolloidal löslichen Farben einer näheren Prüfung zu unterziehen.

Unsere Kenntnis des lebenden Granulozyten hat sich in den letzten Jahren vertieft. *Axel Wallgren* hat genaue Beschreibungen lebender neutrophiler und eosinophiler Granulozyten nach Beobachtungen in Dunkelfeldbeleuchtung gegeben. In dieser Zeitschrift hat der Unterzeichnete vor kurzem über eine Untersuchung der feineren Zellstrukturen und ihrer Veränderungen in lebenden vitalgefärbten und ungefärbten Granulozyten bei Betrachtung in gewöhnlichem Licht berichtet. Auf Grund dieser Beobachtungen ist es jetzt möglich, zu entscheiden, ob die untersuchte Zelle, auch wenn sie keine amöboiden Bewegungen ausführt, tot oder fortgesetzt am Leben ist.

Im folgenden will ich daher über einige Versuche berichten, durch die festgestellt werden soll, in welchem Verhältnis die Zeichen von Leben oder Tod, die sich aus den feineren Strukturen des Protoplasmas ergeben, zu der Färbbarkeit mit Kongorot und Trypanblau stehen.

### *Versuch 1.*

Es werden gleiche Teile Blut und *Seyderhelmsche* Originallösung gemischt. Aus kleinen Tropfen der Mischung wird ein mikroskopisches Präparat hergestellt. Das Deckglas wird mit Vaseline umgeben. Das Präparat wird bei Zimmertemperatur aufbewahrt und nach 24 und 48 Stunden untersucht. Keine lebende Zelle hat sich gefärbt. Von den toten Zellen sind die meisten starr, mit unbeweglichen Granula. In einer geringen Anzahl von Zellen ist das Plasma dünnflüssig, und die Granula sind in lebhafter Brown-Bewegung. Die meisten toten Zellen sind ungefärbt. Nur in der einen oder anderen Zelle haben sich die Granula schwach gefärbt. Der Versuch wird wiederholt und fällt auf dieselbe Weise aus.

*Versuchsergebnis:* *Seyderhelms* Farblösung färbt keine le-

benden Zellen. Von den toten Granulozyten haben nur manche Farbe aufgenommen.

### Versuch 2.

Eine Granulozytenaufschwemmung, die aus der Plasma-säule bei einer Senkungsreaktion entnommen ist, wird 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Gleiche Teile der Aufschwemmung und Seyderhelmscher Farblösung werden gemischt und das Präparat bei 37° untersucht. Nur wenige Granulozyten haben sich gefärbt. Die gefärbten Zellen sind abgestorben und sekundär verändert. Der Zelleib ist geborsten oder aber der Zellkern ist auffallend geschwollen.

*Versuchsergebnis:* Seyderhelmsche Farblösung färbt tote Zellen, die sich sekundär verändert haben.

### Versuch 3.

Kongorot wird mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 10 gemischt. Aus der Farblösung und gleichen Teilen Blut wird eine Mischung hergestellt. Ein kleiner Tropfen davon wird nach 24 Stunden bei 37° untersucht. Alle Granulozyten sind abgestorben. Ein Teil der Zellen ist ungefärbt, die anderen gefärbt. Die gefärbten haben im allgemeinen einen stärker angeschwollenen Kern als die ungefärbten.

*Versuchsergebnis:* Kongorot färbt hauptsächlich sekundär veränderte Zellen.

### Versuch 4.

Kongorot wird im Verhältnis 1 : 10000 in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst. Die Farblösung wird mit gleichen Teilen Blut gemischt, wonach ein kleiner Tropfen der Mischung unter dem Deckglas auf dem Wärmetisch bei 37° untersucht wird. Die Granulozyten führen amöboide Bewegungen aus, die jedoch langsamer als normal sind. Ein Teil der Granularsubstanz hat sich dunkelblau gefärbt. Noch am folgenden Tag sind lebende neutrophile Granulozyten anzu-

treffen. Der Versuch wird wiederholt und fällt auf gleiche Weise aus.

*Versuchsergebnis:* Kongorot wird von lebenden Granulozyten aufgenommen.

#### *Versuch 5.*

Pulverförmiges Trypanblau wird in 0,85 %iger Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Gleiche Teile von der Aufschwemmung und von Blut werden gemischt. Man lässt einen kleinen Tropfen der Mischung sich unter einem Deckglas ausbreiten und untersucht ihn sofort bei 37°. Sämtliche Leukozyten sind hochgradig gefärbt. Sie haben sich alle zu grossen bizarr geformten Haufen angesammelt. Die Farbkörnchen im Zelleib sind deutlich sichtbar. Das Zellplasma ist ganz starr.

*Versuchsergebnis:* Trypanblau in Substanz tötet die Granulozyten sofort.

#### *Versuch 6.*

Aus Trypanblau (Grübler) und 0,85 %iger Kochsalzlösung wird eine gesättigte Farblösung hergestellt. Ein Tropfen der Farbe wird vorsichtig mit einem Tropfen Leukozytensuspension, der aus der Plasmasäule bei einer Senkungsreaktion entnommen ist, umgerührt. Aus der Mischung wird ein mikroskopisches Präparat angefertigt, das auf dem Wärmetisch untersucht wird. Nach 24 Stunden haben sich die Zellen fast bis zur Unkenntlichkeit verändert. Die Kerne sehen wie aufgeblasene Luftballons aus. Ihre Form ist rund oder länglich. Von den verschiedenen Lappen ist selten auch nur eine Andeutung zu sehen. In Dunkelfeldbeleuchtung besteht der Kern aus einer sehr fein granulierten braungefärbten Masse, die sich scharf von der Umgebung abgrenzt. Der Zelleib ist zersprengt und bildet gewöhnlich eine kleine zerfetzte Kalotte irgendwo auf dem monstruös grossen Kern. Die Granularmasse des Zelleibs liegt ganz starr da und ist in manchen Zellen gefärbt, in anderen ungefärbt. In Dunkelfeldbeleuchtung sind die gefärbten Granula blau, rot oder grün. In gewöhnlichem

Licht ist die ganze Zelle schwach blauviolett und undeutlich zu sehen. Bei starker Vergrößerung ist zu konstatieren, dass die Granula sich schwach gefärbt haben, aber zwischen ihnen sieht man einzelne, die dunkel blauviolett sind. Die Granula der eosinophilen Zellen haben sich gefärbt.

*Versuchsergebnis:* Trypanblau bewirkt eine Anschwellung der Zellkerne.

### Versuch 7.

Man lässt einen kleinen Tropfen konzentrierter Trypanblaulösung auf einem Objektglas eintrocknen. Auf diesen Farbfleck wird ein Tropfen frischen Blutes gesetzt, der sich unter dem Deckglas ausbreitet. Die Farbe löst sich in der dünnen Serumschicht auf und diffundiert langsam nach der Umgebung zu. Das Präparat wird, nachdem das Deckglas mit Vaseline umgeben ist, unmittelbar auf dem Wärmetisch beobachtet. In seinen peripheren Teilen sind die Erythrozyten rund. Die Granulozyten führen normale amöboide Bewegungen aus. Etwas näher bei dem gefärbten Gebiet sind die Erythrozyten am Rande ausgeknagt. Manche Granulozyten bewegen sich vorwärts, aber andere sind durch mehrere Fäden am hinteren Teil der Zelle auf der Unterlage befestigt und liegen still und ausgebreitet da. -- Noch näher bei dem gefärbten Gebiet haben die Erythrozyten Stechapfelform angenommen. Die Granulozyten liegen still, ohne Lebenszeichen ausgebreitet da. In Dunkelfeldbeleuchtung erscheinen die Granula schwach bläulich. In gewöhnlichem Licht sind sie ungefärbt. — Im Bereich des Farbfleckes sind die Kerne gefärbt und aufgequollen wie im vorhergehenden Versuch. Die Granula sind in manchen Zellen gefärbt, in anderen ungefärbt.

*Versuchsergebnis:* Die Granulozyten sterben ab, wenn sie eine Spur von Trypanblau aufgenommen haben.

### Versuch 8.

Ein Objektglas wird auf dieselbe Weise wie in den vorhergehenden Versuchen mit Trypanblau präpariert. Man lässt



einen Tropfen 24 Stunden alter Leukozytensuspension aus der Plasmasäule bei einer Senkungsreaktion sich unter dem Deckglas auf dem Farbtropfen des Objektglases ausbreiten. Einige Minuten danach wird das Präparat in Dunkelfeldbeleuchtung durchgemustert. In unmittelbarer Nähe des Farbfleckes hat sich nur eine oder die andere Zelle gefärbt. Der Kern ist bräunlich und etwas gequollen. Die Granula sind in manchen dieser Zellen gefärbt, in anderen ungefärbt.

Nach 24 Stunden wurde das Präparat, das in Zimmertemperatur aufbewahrt worden war, von neuem durchgesehen. Im Farbgebiet ist etwa die Hälfte der Zellen gefärbt. Im allgemeinen sind die Zellen, in denen sich die Granula gefärbt haben, grösser als die untingierten. Der aufgequollene Kern ist oft teilweise entblösst. Die ungefärbten Zellen sind kleiner und haben unversehrte Konturen. Doch kommen Ausnahmen von dieser Regel vor.

*Versuchsergebnis:* Trypanblau färbt im allgemeinen sekundär veränderte Zellen.

### *Versuch 9.*

Es wird ein Deckglaspräparat aus gleichen Teilen frischen Blutes und Trypanblaulösung 1 : 10000, in der die Farbe in 0,85 %iger Kochsalzlösung aufgelöst ist, hergestellt. Die Granulozyten führen amöboide Bewegungen aus, nehmen aber keine Farbe auf.

*Versuchsergebnis:* Lebende Granulozyten enthalten kein Trypanblau.

Aus den Versuchen 1 und 2 geht hervor, dass wir durch Färben von Granulozyten mit der *Seyderhelmschen* Farblösung nicht entscheiden können, ob die Zelle tot oder lebendig ist. Zellen, die kurz vorher abgestorben sind, nehmen noch keine Farbe auf. Auch wenn die beiden Komponenten der Farblösung, Kongorot und Trypanblau, genauer untersucht und die Granulozyten mit stärkeren Farblösungen behandelt werden, verhalten sich die toten Zellen auf gleiche

Weise. Die Zellen, die kurz vorher abgestorben sind, färben sich nicht. Erst wenn sich die Granulozyten sekundär verändert haben, wenn der Kern aufgequollen und der Zelleib zerfetzt ist, nehmen sie gewöhnlich Farbe an.

In einem Versuch war ein toter neutrophiler Granulozyt, der mit Trypanblau 1 : 50 behandelt worden war, ungefärbt. Während die Zelle beobachtet wurde, schwoll sie an und barst. Hiernach war sie dauernd ungefärbt, aber nachdem das Präparat 24 Stunden bei 16° aufbewahrt worden war, hatte sich ein grosser Teil der Granula dunkelblau und das Plasma hellblau gefärbt.

Die Erklärung *Seyderhelms*, dass die Zellmembran des lebenden Granulozyten nicht für kolloidal lösliche Farben permeabel sei, hält einer näheren Prüfung nicht stand. Es wurde bereits erwähnt, dass die Granulozyten nach neueren Untersuchungen nicht mit einer wirklichen Grenzmembran versehen sind. Aus Versuch 4 geht überdies hervor, dass ein lebender Granulozyt Kongorot aus der Umgebung aufnimmt, wenn die Farbe der Zelle nur in richtiger Weise zugeführt wird. Somit kann ein kolloidaler Farbstoff von einem lebenden Granulozyten aufgenommen werden. Trypanblau, das der Zelle auf gleiche Art zugeführt wird, wird dagegen nicht aufgenommen. Aus den Versuchen 5—7 wird ersichtlich, dass das Trypanblau für die Granulozyten ein schnell tötendes Gift ist. Vielleicht verhindert die Anwesenheit von Trypanblau in der *Seyderhelmschen* Farblösung, dass die lebenden Zellen aus dieser Kongorot aufnehmen.

Bei den Versuchen 6 und 7 waren in den Granulozyten eigentümliche Veränderungen der Zellkerne zu bemerken, die hochgradig anschwellen. Deutlich sieht man eine solche Zelle nur bei Dunkelfeldbeleuchtung. Der Kern tritt da als eine meistens scharf konturierte, gleichmässig feinkörnige Masse hervor. Nur selten ist zu erkennen, wie sich die feinen braunen Granula in die Umgebung zerstreut haben. Offenbar steht die fragliche Kernveränderung mit der Färbung mit Trypanblau in Zusammenhang. Lässt man eine konzentrierte Farblösung auf die Granulozyten einwirken, so schwellen die Kerne

aller Granulozyten auf die beschriebene Weise an. Der angeschwollene Kern ist jedoch in gewöhnlichem Licht optisch leer und entzieht sich daher leicht der Beobachtung. Ist man auf die Erscheinung aufmerksam geworden, so erkennt man auf dieselbe Weise veränderte Zellkerne auch in Präparaten, die nicht mit Trypanblau behandelt worden sind. Der Kern erscheint alsdann als eine gewöhnlich ovale, klare, strukturelose Blase mit scharf markierter Grenze. Ein auf die eben beschriebene Weise veränderter Kern ist also nicht nur für eine mit Trypanblau behandelte Zelle typisch, sondern er stellt eine, wenn auch etwas ungewöhnlichere Form bei der Nekrobiose der Granulozyten dar.

Da im Zusammenhang mit den Untersuchungen, über die hier berichtet worden ist, auch andere postmortale Vorgänge festgestellt werden konnten, möchte ich die dabei erhobenen Befunde etwas genauer beschreiben. Die Granulozyten nehmen in der Pathologie eine Sonderstellung ein. Die Zellen sind hochdifferenziert und sind mit zahlreichen Aufgaben betraut. Noch nach dem Tod der Zelle spielen die aus den toten Granulozyten freigemachten Enzyme eine wichtige Rolle bei den Einschmelzungsprozessen, die mit der eitrigen Entzündung einhergehen.

Unsere Kenntnis von der Veränderung der Granulozyten nach dem Tod der Zellen ist jedoch ziemlich begrenzt. *Zadek*, der Granulozyten in Exsudat genauer studiert hat, ist der Ansicht, dass die gelapptkernigen weissen Blutkörperchen infolge von fermentativ wirkenden Stoffen in dem Exsudat schnell degenerative Veränderungen erleiden. Wenn die Zelle degeneriert, quillt das Protoplasma auf, verändert sich die Färbbarkeit, erscheinen Vakuolen im Protoplasma und nehmen die Granula nur mit Schwierigkeit Farbe auf. Es treten Fetttropfen im Protoplasma auf, das in weit fortgeschrittenen Fällen zerfallend und »nekrotisch« ist. Der Kern löst sich auf oder wird pyknotisch.

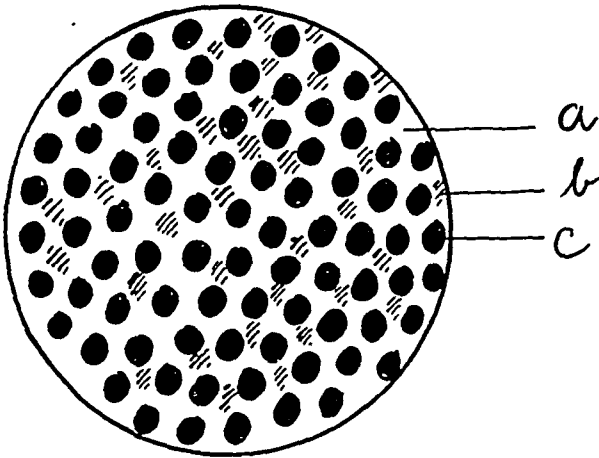
Fertigt man aus einem Tropfen Blut ein Nativpräparat an und bewahrt es einige Tage in Zimmertemperatur auf, so sind danach alle Granulozyten abgestorben. Die toten Zellen

vertreten dabei zwei verschiedene Typen. Sie können koaguliert sein, wobei das Protoplasma starr ist und die Granularmasse unbeweglich daliegt, oder sie sehen wie runde Kugeln aus, und ihre Granula befinden sich in lebhaftem Brown-Tanz. Zwischen diesen beiden Formen finden sich Übergänge. Das Protoplasma kann in ein und derselben Zelle an den einen Stellen starr, an den anderen dünnflüssig sein und Brown-Bewegung in der Granularmasse zeigen. In einer Untersuchung über die Einwirkung des Lichtes auf die neutrophilen Granulozyten beim Menschen konnte *Axel Wallgren* nachweisen, dass Zellen, die von dem Licht geschädigt worden waren, koagulierten oder »kolliquierten«. Er konnte auch eine bestimmte Temperaturgrenze, 18—20°, feststellen. Bei höheren Temperaturen »kolliquierten« die Zellen, bei niedrigeren wurden sie starr.

Die dünnflüssige Zelle bietet ein besonderes Interesse dar. *Axel Wallgren* sagt von ihr, sie »wandelt sich in einen mehr oder weniger losen Plasmaklumpen, in dem die grossenteils freie Tropfen bildende Granularmasse in heftiger Brownscher Bewegung umherwirbelt«. Auf die gleiche Art veränderte Granulozyten sieht man sozusagen physiologisch im menschlichen Speichel, wo sie die sogenannten Speichelkörperchen bilden. *Zimmermann* ist der Ansicht, dass die »körnigen Zerfallsprodukte des Cytoplasmas« Brown-Bewegungen in der Zelle ausführen, und nimmt an, dass der flüssige Inhalt der Zelle von einer Membran umgeben ist.

Bevor die Speichelkörperchen und die im Blutpräparat auf gleiche Weise veränderten Granulozyten näher besprochen werden können, ist auf den feineren Bau der normalen Granulozyten einzugehen. In dieser Zeitschrift habe ich neu-lich über den feineren Bau und die Funktion der menschlichen Zellen berichtet. In Granulozyten wurden dabei im Protoplasma der Zellen zwei verschiedene Systeme nachgewiesen. Das eine System war aktiv beweglich und bestand aus einer graulichen Grundsubstanz (a in dem obenstehenden Schema), in der ausserdem zahlreiche weisse Tropfen zu finden waren (b in dem Schema). Das andere System

wurde passiv von dem aktiv beweglichen System in der Zelle hin und her transportiert. Es bestand aus Tropfen von etwas variierender Grösse (c in dem Schema). Die Tropfen teilten sich oft in neue Tropfen, die von dem aktiv beweglichen System nach verschiedenen Richtungen geführt wurden. Das



Schematische Darstellung eines Granulozyten.

passiv bewegliche System enthält die für die verschiedenen Granulozyten charakteristische Granularsubstanz, die Chondriosomensubstanz und Oxydase. Die weisse Substanz in dem aktiv beweglichen System ist hinsichtlich ihrer chemischen Natur nicht näher bekannt. Zwischen den Tropfen des passiv beweglichen Systems und den weissen Tropfen des aktiv beweglichen Systems herrscht eine intensive Wechselwirkung. Die weissen Tropfen ragen oft in die passiv beweglichen Tropfen hinein, und beide Arten von Tropfen können dicht zusammengeschlossen weit in den Zelleib in dem aktiv beweglichen System hineintransportiert werden.

Die Speichelkörperchen und die auf gleiche Weise veränderten Granulozyten in Blutpräparaten sind als kolliquiert aufgefasst worden. Man hat sich vorgestellt, dass proteolytische Enzyme im toten Granulozyten freigeworden seien und die Zelle infolgedessen eine Autodigestion durchgemacht habe,

wobei der Zellinhalt dünnflüssig geworden wäre. Man fragt sich jedoch, warum die koagulierten Zellen mit völlig starrem Protoplasma sich nicht später auf dieselbe Weise auflösen oder warum abgestorbene Granulozyten, in denen das Plasma nur hier und da dünnflüssig ist, nicht allmählich gänzlich aufgelöst werden. Als ich solche Zellen einige Tage im Mikroskop verfolgt hatte, konnte ich feststellen, dass die dünnflüssigen Teilen des Plasmas keine Neigung zeigten, sich auszubreiten.

Betrachtet man ein Speicheldrüsenkörperchen in Dunkelfeldbeleuchtung, so sieht man in der Zelle eine Menge kleiner leuchtender Körnchen in lebhafter Brown-Bewegung. Wenn man die Bewegungen eines einzelnen Körnchens verfolgt, findet man, dass seinen Wanderungen gewisse Grenzen gesetzt sind. Das Körnchen bewegt sich innerhalb eines bestimmten Gebietes. Die Grösse dieses Gebietes wechselt in verschiedenen Teilen der Zelle. Durch frühere Untersuchungen habe ich mich überzeugen können, dass die in Dunkelfeldbeleuchtung leuchtenden Granula in den neutrophilen Leukozyten hauptsächlich von der weissen Substanz (b) in dem aktiv beweglichen System gebildet werden. Die Tropfen, die dem passiv beweglichen System angehören (c), sind nicht in Dunkelfeldbeleuchtung zu sehen. Betrachtet man die gleiche Zelle nun in gewöhnlichem Licht in einem möglichst guten optischen System, so findet man, dass die graue Substanz in dem aktiv beweglichen System (a) zu einer zitternden gallertartigen Masse angeschwollen ist. Die passiv beweglichen Tropfen (c) sind immer noch vorhanden und befinden sich in einigem Abstand von den nahegelegenen ähnlichen Tropfen. Die gelatinös aufgequollene aktive Substanz bildet hierdurch ein grobfaseriges Netzwerk (a) um die Tropfen. Da die aktiv bewegliche Substanz in zitternder Bewegung ist, nehmen auch die passiv beweglichen Tropfen an dieser Bewegung teil und führen dadurch charakteristische Brown-Bewegungen in der sie umgebenden losen Masse aus.

Wenn die Brown-Bewegung sehr lebhaft ist, gewinnt man bisweilen den Eindruck, dass die Tropfen b oder c in dem

Schema übereinander geschleudert werden. Zimmermann nimmt an, dass die Leukozyten aufquellen und infolge der Alkaleszenz des Speichels in Speichelkörperchen umgewandelt werden. Durch vorsichtige Neutralisierung kann die Zelle ihr ursprüngliches Volumen zurückgewinnen. Einen Beitrag zur Frage von der Zusammensetzung der Speichelkörperchen liefert folgende Beobachtung. In einer mit Speichel isotonischen Trypanblaulösung 1 : 100 wurde ein Speichelkörperchen verfolgt. Dieses war kugelförmig, mit der Granularmasse in lebhafter Brown-Bewegung. Während die Zelle etwa eine Stunde lang beobachtet wurde, schwoll der Kern allmählich an. Der Unterschied zwischen den Lappen verwischte sich zu derselben Zeit, wo der Kern an Volumen zunahm. Nach und nach erstarrte der Zelleib von der Oberfläche aus. Die Zahl der tanzenden Körner verminderte sich. Schliesslich war so gut wie alles starr. Der Kern war jetzt 4 mal so gross, wie er ursprünglich gewesen war. Der Zelleib war zerfetzt und bedeckte nur teilweise den grossen Kern, der keinen Platz mehr in der Zelle hatte. In dem erstarrten Plasma war die gewöhnliche Struktur des Zelleibes wiederzufinden, was ja die Annahme weiter bestätigt, dass das Plasma in den Speichelkörperchen anschwillt, aber sich nicht auflöst.

Aus Untersuchungen von *Holter* und *Lindstrom-Lang* an Amöben und Echinodermeneiern hat sich ergeben, dass die Enzyme Peptidase und Katalase, die einfache Peptide und  $H_2O_2$  spalten, im Hyaloplasma der Zellen wiedergefunden werden. Zusammen mit *Doyle* konnte dagegen *Holter* nachweisen, dass Amylase, die hochpolymere Verbindungen angreift, in die Mitochondrien der untersuchten Zellen lokalisiert war. In den Granulozyten gehört die Chondriosomensubstanz dem passiv beweglichen System an. In meinen früher beschriebenen Versuchen konnte auch Oxydase in dem passiv beweglichen System festgestellt werden. Es liegt daher zugleich die Annahme nahe, dass auch andere Enzyme, also auch die für die Tätigkeit der Eiterzellen so wichtigen proteolytischen Enzyme in den passiv beweglichen Tropfen (c in dem Schema) anzutreffen sein werden.

Es ist von besonderem Interesse, die Schicksale der erwähnten Tropfen nach dem Tode der Granulozyten zu verfolgen zu suchen. Bedeutsame Aufschlüsse liefert diesbezüglich folgende Beobachtung: Ein Blutpräparat war mit Kongorot 1 : 10000 gefärbt worden und wurde untersucht, nachdem es 6 Tage in Zimmertemperatur gestanden hatte. Ein neutrophiler Granulozyt war wie ein kleiner Ballon angeschwollen. Der Kern hatte 4 leicht vergrößerte Lappen und lag im Innern der Zelle. In der Oberflächenschicht der Zelle war die Granularsubstanz wiederzufinden, und zwar sowohl die mit Kongorot gefärbten Tropfen, die dem passiv beweglichen System (c) angehören, als die weissen Tropfen des aktiv beweglichen Systems (b). Stellenweise führten die Granula in begrenzten Gebieten Brown-Bewegungen aus. Hierbei konnte man sehen, wie die eben erwähnten verschiedenen Arten von Tropfen dicht zusammengeschlossen eine kleine Kugel bildeten, deren eine Hälfte blau und deren andere gelblich war. Während der Beobachtungszeit konnte 3 mal festgestellt werden, wie die eben beschriebenen kleinen Kugeln nach einer heftigen Brown-Bewegung aus der Zelle heraus in die Umgebung geschleudert wurden, wo sie unter lebhaftem Brown-Tanz ziemlich schnell aus dem Gesichtsfeld verschwanden.

In einer 1 Monat alten Leukozytensuspension, die aus der Plasmasäule bei einer Senkungsreaktion entnommen war, sahen die Granulozyten anders aus. Sie hatten eine Struktur, die stark an die in ungeschädigten Zellen erinnerte. Die vorhin erwähnten zwei Arten von Granula traten auch hier auf. Die Körner erschienen jedoch etwas kleiner als in der lebenden Zelle. In unmittelbarer Nähe der Granulozyten waren lange feine Fibrinfäden aus dem Zitratplasma ausgefallen, was ja darauf deutet, dass in der Flüssigkeit, welche die Zellen umgab, keine proteolytischen Enzyme wirksam gewesen waren.

Es geht also aus den hier mitgeteilten Beobachtungen hervor, dass die Granula, die aller Wahrscheinlichkeit nach die Enzyme des Granulozyten enthalten, noch lange nach dem Tod der Zelle unaufgelöst erhalten bleiben. Indessen sind



weitere Forschungen vonnöten, um zu ermitteln, auf welche Weise Enzyme bei den pathologischen Prozessen, bei denen Granulozyten an der Gewebseinschmelzung mitwirken, aus den Granulozyten freigemacht werden.

- Duspiva, Franz*: Die cytologischen Grundlagen der protoplasmatischen Verankerung der Enzyme in Nord, F. F. und Weidenhagen, R. Handbuch der Enzymologie. Leipzig 1940, Bd. I, S. 11.
- Holten, H. u. Doyle, W. L.*: C. R. Lab. Carlsberg. Sér. Chim. 22 (1938), 219. Ref. nach Duspiva.
- Holten, H. u. Lindstrom-Lang, K.*: S. B. Akad. Wiss. Wien, mathemat.-naturwiss. Kl. II, 145 (1936), 898. Ref. nach Duspiva.
- Kemény, Georg*: Klin. Woch. 15, 694 (1928).
- Köhler, Hans*: Zentralbl. f. Chirurgie. 33, 2066 (1926).
- Molnar, G.*: Bruns Beiträge zur klin. Chirurgie. 161, 216 (1935).
- Rosenstein, Paul*: Zentralbl. f. Chirurgie. 33, 2070 (1926).
- Seyderhelm, R.*: Deutsch. med. Woch. S. 180.
- Wallgren, Axel*: Verhandl. der deutsch. pathol. Gesellschaft. 24. Tagung in Wien, Jena 1929.
- Wallgren, Ivar*: Acta path. et microb. scand. (im Druck).
- Zadek, I.*: Die Zytologie der Exsudate und Transudate in Hirschfeld, H. u. Hittmair, A. Handbuch der allgemeinen Hämatologie, Berlin und Wien 1933, Bd. I/2, S. 1377.
- Zimmermann, K. W.*: Die Speicheldrüsen der Mundhöhle und die Bauchspeicheldrüse in v. Möllendorff Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Berlin 1927, Bd. V/1, S. 214.

DANSK PATOLOGFORENINGS 5. MØDE 16/9 1942  
I KØBENHAVN.

*The Fifth Meeting of the Danish Pathological Society,  
September 9, 1942.*

*Cinquième séance des pathologistes danois le 9 septembre 1942.*

*Fünfte dänische Pathologentagung am 9. September 1942.*

Martin Kristensen: *Statistical Aspects of the Mutation-like Fermentation.*

After a brief mention of the appearance of the mutation-like fermentation on macroscopic inspection of cultures in fluid and on solid media, the question of the possibility of direct observation of the appearance of the mutation in the individual bacterium is discussed. Such observation will be very difficult, in the first place, because it is uncertain whether it will be possible by watching the individual bacterium to see whether it has mutated. In the next place, in the mutations we can ascertain macroscopically, only one individual out of many millions will mutate within a reasonable length of time. If the mutation occurs so frequently that the mutating individuals are easy to ascertain, the culture will macroscopically convey the impression of a primarily fermenting culture.

Qualitative studies on the appearance of the mutation-like fermentation have been reported by many previous authors, but only feeble attempts have been made at a quantitative statistical estimation of the frequency of mutation under various conditions. As the basis for such an account, a fairly large number of uniform culture tubes may be inoculated, and then it is recorded daily how many tubes present the appearance of fermentation. Thus we may reckon that the appearance of fermentation in a tube results from mutation in a single bacterial individual.

For a more exact estimation of the material it is important to record it graphically in a suitable coordinate system and to set up a suitable norm after which the observed course of the fermentation can be estimated. The number of days is plotted along the axis of abscissas. For ordinate one might plot the number of

tubes involved: either the number of tubes showing mutation in each 24-hour period, or the total number of tubes presenting mutation up to the juncture given by the abscissa — or the number of tubes in which no mutation has appeared yet. For norm we might set up a constant rate of mutation or a frequency of mutation with normal distribution round a typical value. But there appears to be no rational motivation for either norm. On the other hand, we may set up the deterioration of a radioactive substance as norm. For here the simple rule holds good that within each unit of time it is continually the same fraction of the particles present at the commencement of the period that undergo transformation. This course of transformation is the same as the course of the monomolecular reaction in chemistry. In the coordinate system mentioned this course will be depicted by a falling exponential curve; and this applies both to the absolute rate of transformation and to the number of the not yet transformed particles (atoms, molecules, bacteria).

As it is difficult from the form of a curve to see whether it be just an exponential curve, it is more expedient to plot the *logarithm* to the number of the not yet transformed bacterial cultures as ordinates. By this, the curve for the »monomolecular« course becomes a straight line. In the registration of the course of mutation for bacterial cultures it is essential as far as possible to make correction for the length of time that may reasonably be assumed to pass between the appearance of the mutation and the macroscopic fermentation. The frequency of mutation may be determined in relation to the total volume of the not yet mutated cultures or, preferably, in relation to the number of bacteria present in the not yet mutated cultures at any given point of time. As a matter of fact, when a part of the curve was observed to take a fairly straight course, the bacterial count was found to keep fairly constant in the same period.

In many instances, the mutation curve falls at first relatively slowly and later more abruptly, taking the form of an approximately straight line. In *Salmonella dublin* the mutation for l-arabinose commences at such an early juncture that it is reasonable to assume the mutability was present originally, independent of the presence of arabinose. The subsequent increase in the rate of mutation is due to cooperation between the presence of the arabinose and the long standing of the culture without transplantation; one of these factors alone is not sufficient. On subcultivation of certain variants of the typhoid bacillus in a number of xylose tubes, it has happened sometimes that it took several weeks before the mutations commenced to appear, and then the mutation turned up in a majority of the tubes within the next couple of months.

Even though we have to reckon it as a natural quality of the mutation phenomenon that the individual mutations turn up in a very accidental manner, distributed over a period that varies considerably in proportion to the average mutation juncture, it happens not infrequently that the fermentation appears almost simultaneously in a large number of tubes. In most cases, very likely, this will be due to the circumstance that the interval between the inoculation of the medium and the occurrence of the mutation is short as compared to the interval between the mutation and the observation of the resulting fermentation. The same typhoid strain may segregate in frequently mutating variants which regularly give visible fermentation within about one week and in infrequently mutating variants with a wide dispersion of the fermentation junctures. Subcultures from the same culture may yield one or other of these two types of visible mutation, all depending on the volume of the subculture.

The monomolecular course appears to be the only rational norm, and thus, for instance, there is no reasonable biological basis for a »bimolecular« reaction course.

#### Discussion:

Orla-Jensen emphasizes that changes in the culture medium on standing may give phenomena that may be mistaken for mutations.

Reply to Professor Orla-Jensen. I have also looked into the question mentioned.

Gradually the reaction in the xylose tubes becomes increasingly acid, when the tubes are left in the incubator for some length of time. But, when subcultures from the tubes in which the bacteria have brought about an additional acid formation yield yellow colonies on fresh xylose plates, it seems most reasonable to assume it to be a mutation-like fermentation.

It may be that partial conversion of the sugar will be useful if the purpose is merely to obtain a good growth. But in the employment of fermentation reactions for diagnostic use, conversion of the sugar ought to be avoided as far as possible. For only in that way may we expect to find the sharpest differences between the reactions of the various bacterial strains.

C. Borg Petersen: *Leptospira saxkoebind*, a new serological leptospira type.

#### Summary:

After some orientating remarks on leptospire and leptospirose an account is given of the serological examination of two leptospira strains, isolated from the kidneys of two specimens of *apodemus*

*flavicollis*. Mutually serologically identical, the two strains deviated serologically from all serological types of leptospira established hitherto, although they showed serological relationships to the types hebdomadis, hc, 3705 and sejroe, thus adding a new member to this group of serologically related leptospire, which may conveniently be referred to as »the wider hebdomadis group«.

As a preliminary name for the new type »*l. saxkoebing*« is suggested, Saxkoebing being the place of origin for the two strains mentioned above. Perhaps another name will have to be considered later, in case some Italian strains isolated by Mino in 1940, and classified by him in 1942 as sejroe strains, on further examination turn out to be serologically identical with the saxkoebing strains.

The virulence of *l. saxkoebing* for guinea-pigs is slight. Of 24 infected animals only 3 died, partly with complicating infections; none of these 24 animals showed any trace of icterus. Likewise the virulence of *l. saxkoebing* for young white mice and rats seems to be slight, but only a few experiments were performed. Both in mice and in rats the infection resulted in the animals becoming permanent leptospira carriers.

Human infection with *l. saxkoebing* has not yet been observed in Denmark.

Absorption experiments on certain sera from human cases of leptospirosis seem to indicate the existence in Denmark of still another leptospira of the wider hebdomadis group, apart from the 5 already known.

(The work will later be published in a more detailed form.)

No discussion.

Kai Schmith: *On the Effect of p-(aminomethyl)-benzene-sulfonamide. A Chemotherapeutic with a Fundamentally New Mode of Action.*

#### S u m m a r y:

Chemically this substance differs from the usual sulfonamides in this, that in para-position to the sulfonamide-group there is not an amino-group, but an aminomethyl-group, *i. e.* that the  $\text{NH}_2$ -group is not bound directly to the benzene nucleus.

In previous works it has been demonstrated that the effect of this substance *in vitro* is not neutralized by *p*-aminobenzoic acid as is the case with the other sulfonamide derivatives.

Now its effect *in vitro* is shown to differ from that of the sulfonamides in general in several respects. Thus its bacteriostatic effect is equally strong whether the bacteria are sensitive or resistant to the ordinary sulfonamides. Its inhibitory effect on pneumococci sets in at once, without any preliminary initial phase

of growth (»lag phase«), and its effect is equally powerful against a large inoculum and a small one.

The significance of these observations is discussed.

(Will be published in extenso in Acta path. et microbiologica scand.)

No discussion.

## DANSK PATOLOGFORENINGS 6. MØDE 14/10 1942 i KØBENHAVN.

*The Sixth Meeting of the Danish Pathological Society,  
October 14, 1942.*

*Sixième séance des pathologistes danois le 14 octobre 1942.*

*Sechste dänische Pathologentagung am 14. Oktober 1942.*

Harald Gormsen: *The lesions of the pituitary in Simmond's disease, With autopsy report of 2 cases.*

2 cases of Simmond's disease with autopsy findings are reported: a woman, aged 35, with a chromophobe adenoma of the anterior pituitary, and a man, aged 38, with an atypical Simmond's syndrome with hyperthyroidism. In the latter case the pathological findings were an atrophic fibrosed pituitary (chronic perihypophysitis?) with predominance of eosinophilic cells in the remaining part of the anterior pituitary. The thyroid gland showed marked signs of hyperthyroidism (caused by the predominance of the eosinophilic cells of the pituitary?) There was pronounced atrophy of the suprarenals and the gonads.

In addition, a summary is given of the lesions of the pituitary in 75 cases from the literature of Simmond's disease verified by autopsy.

(The report will appear in »Nordisk Medicin« 1943 with an English summary, and — if possible — in »Endocrinology«.)

No discussion.

Petri, Norgaard, Trautner & Kiær: *On the changes produced (in swine) by resection of the fundus of the stomach.\*)*

In pups and pigs, total gastrectomy produces constantly a severe, most often chronic, fatal neuro-cutaneous symptom complex (experimental endogenous (gastroprival) pellagra (Petri and collaborators, 1936)). Clinically and morphologically this lesion is identical with pellagra in man and feeding pellagra in swine and dogs; it

\* ) Presented by Svend Petri.

is attributable to the elimination of a specific antipellagrous factor in the stomach. Attempts have been made to elucidate the causation of this lesion by means of various systematic experimental studies.

The experiments mentioned here, which were commenced in 1937 by one of us (Petri), have aimed through subtotal or total elective resection of the fundus to elucidate the significance of the fundus region to the development of pellagra. The older part of this material has been worked up in Nørgaard's dissertation on the histological changes in the central nervous system in experimental endogenous pellagra (Einar Munksgaard, October 1942).

A review is given of the clinical and morphological changes encountered in the two groups of animals on which these fundus resections have been performed (illustrated by demonstration of diapositives).

*Subtotal fundus resection* (8 swine with an observation period of 128—499 days) has constantly produced an inhibition of growth, as a rule with spontaneous remission. In 4 of these animals, moreover, this condition was accompanied by clinical changes in the central nervous system (1) or pellagrous changes in the skin and hair (3). The remnant of the fundus had undergone hypertrophy. In 3 of the 4 last-mentioned animals the central nervous system showed degenerative changes.

*Total resection of the fundus* (14 swine with an observation period of 67—379 days) produced a clinically and morphologically well-characterized pellagrous symptom complex, varying in degree, though most often very severe. All the animals that were under observation for over 6 months presented pronounced morphological degenerative changes in the central nervous system.

Comparison of the morbid features after total fundus resection and total gastrectomy showed almost complete concordance in nature and chronological appearance, whereas the degree of the affection has been varying somewhat. The changes in the central nervous system, however, have been identical clinically as well as morphologically. From these findings it seems justified to conclude that etiologically the fundus is the primarily decisive region for the development of the degenerative changes in the central nervous system, whereas also the cardia and pylorus play a certain (secondary?) role in the appearance of the other pellagrous changes.

With reference to our previous investigations on the antipernicious anemic principle in the total-fundus-resected swine (Petri and collaborators, 1941) thus, the fundus has proved etiologically to be the primarily decisive factor in the development of the degenerative changes in the central nervous system, as well as in the formation of the active liver principle.

No discussion.

Gunnar Teilm: *Some Obliterating Vascular Lesions (Hepatic Thrombophlebitis (Chiari's Disease) and Thrombo-Angiitis obliterans (Buerger's Disease)).*

A number of subacute and chronic cases of vasculitis of obscure origin show, besides their more or less characteristic pathologic-anatomical and clinical picture, some common features which lend support to the view that these vascular lesions are related, of allergic nature.

In the case of a woman, aged 36, with a past history of good health, who now was suffering from hepatic thrombophlebitis (Chiari's disease), a marked degree of ascites developed within a few weeks and, subsequently, venous stasis of the left arm.

Autopsy revealed a pronounced stasis of the liver with recent and older, inflammation-like, processes of thrombosis in all the veins of the liver, extending out to their inlets into the inferior vena cava.

Microscopic examination showed similar changes as described by Rössle and Inthorn, also in such early stages that the development of the obliteration could be followed. The oldest changes were seen in the large veins, nearest the vena cava, while the small veins showed very recent changes, with detachment of the endothelium, net-formation and endothelial proliferation. The splenic vein showed here and there some changes of the same nature. In addition the left axillary vein showed fresh thrombosis.

Of Chiari's disease, which previously was taken to be a syphilitic vascular lesion, only about fifty cases have been described so far. The demonstrated histological changes show a marked resemblance to rheumatic and experimentally produced allergic vascular changes (Rössle, and others). The peripheral venous changes observed in the present case are presumably to be interpreted as migrating thrombophlebitis, which is closely related to the vascular changes in Buerger's disease, forming thus a connection between the two vascular lesions.

So hepatic thrombophlebitis and thrombo-angiitis obliterans may both be accompanied by phlebitic changes in more distant veins, related to migrating thrombophlebitis.

In addition, two cases of thrombo-angiitis obliterans are reported. In one case — a man, aged 43 — this lesion was simultaneous with the occurrence of typical changes in arteries of the extremities and pelvis and also in visceral arteries (in the heart and gastrointestinal tract). In the other case — a man, aged 53 — the autopsy showed the fresh stage of Buerger's disease with large parietal thrombi in the arteries (descending aorta, renal and splenic arteries), infarcts in the kidneys and spleen, and thrombosis of the veins.

Both these cases show that Buerger's disease involves a general



vascular lesion, and that even though this disease is known chiefly as an affection of peripheral vessels, it may also involve the aorta and arteries to various organs (heart, gastrointestinal tract, spleen, kidneys).

No discussion.

*Gunnar Teilum: A Case of Gaucher's Disease.*

In a case of Gaucher's disease — a woman, aged 50 — the post-mortem examination revealed not only pronounced changes in the spleen, bones, liver and lymph glands, but also fairly large clusters of typical Gaucher cells in the *posterior pituitary lobe* and *hypothalamus*, represented here by the microglia cells, belonging to the reticulo-endothelial system.

In this connection it is to be emphasized that not only xanthomatosis (in Schüller-Christian's syndrome) but also Boeck's sarcoid may be localized to the posterior pituitary lobe and hypothalamus, and in some cases give rise to diabetes insipidus.

Gaucher cells have not been demonstrated previously in the pituitary and hypothalamus or — as far as adults are concerned — outside the spleen, liver, bones and lymph glands (Thannhauser).

No Gaucher cells were demonstrated in other organs.

No discussion.

*Gunnar Teilum: A Case of Lipoid Pneumonia.*

In a woman, aged 76, who died of cerebral hemorrhage, the autopsy revealed several fairly large depressions on the surface of the lungs, mostly the right, brought about by scattered fibrous foci. The pleuræ appeared normal. Pieces of lung tissue excised from these areas sank in water, leaving on the surface of the water a large oily spot with colored rings. Microscopy showed large masses of lipid material in the alveoli (Sudan III stain), besides a chronic productive inflammatory process with accumulation of fat in the tissue and foreign-body giant-cells. No microscopic changes were seen in the hilar lymph glands.

The information was obtained that the patient had been suffering from cardiospasm for 20 years and that every two weeks she introduced a stomach tube herself. The lipoid pneumonia is then explainable as due to aspiration of oil employed for lubrication of the tube. Not only cod liver oil and mineral oil, but also other, less common, oils and facts are able to produce lipoid pneumonia. In most of the reported cases the patients were infants, many of them with harelip or defective swallowing reflex. In the adult patients the lesion has developed relatively often after instillation of mentholated mineral oil or similar remedies in the nose. In other cases the patients have been troubled with bulbar

paralysis or, as in the present case, cardiospasm. Vegetable oils cause less reaction in the lung than do mineral and animal oils.

No discussion.

Helge Tramsen: *Extreme Fibrosis of the Myocardium in a Child, 11 Days old.*

Congenital heart lesions are rarely reported as the cause of death in post-mortem statistics. Their etiology is largely obscure. Many of them consist entirely in malformation of the valves or septum, or in a persistent ductus arteriosus. Often the lesions are described as congenital infections, causing myocarditis or endocarditis.

Persistent ductus arteriosus is the most frequent of all congenital heart lesions, and very often it is associated with stenosis of the aortic tube.

The diseases of the myocardium known as congenital are chiefly looked upon as brought about by infections. Previously they have been ascribed to poor circulation, with decreased blood supply.

The post-mortem examination of a child, 11 days old, who died without any preceding illness revealed some marked abnormalities of the heart. The heart was enlarged, and weighed 75 g., with hypertrophy of the myocardium on both sides. The ductus arteriosus was patent, and there was stenosis of the aortic tube. The pulmonary and aortic valves were markedly abnormal, red, thickened and, at the same time shrunk to such an extent that the aortic valves nearly closed the entrances to the coronary arteries. The myocardium showed extensive fibrous degeneration in streaks. Histological diagnosis: Myofibrosis.

Here, then, we have the case of a child, 11 days old, presenting a persistent ductus arteriosus and also extensive fibrosis of the myocardium. It is impossible to see any connection between these two abnormalities. The fibrous degeneration of the myocardium probably results from the obstruction to the coronary circulation due to the shrinkage of the aortic valves, which nearly closed the entrance to the coronary arteries. Most likely the myocardial degeneration has been present for some length of time during fetal life, and it may be explained as a result of a fetal rheumatic infection. No doubt, however, the obstruction to the coronary circulation must at any rate have been attributable to the fibrosis.

Discussion:

Poul Freudenthal: I should like to ask Dr. Tramsen whether the case described here has been investigated in keeping with the theories advanced by Spitzer in his comprehensive and fundamental work on malformations of the heart.

It is indeed a great number of congenital heart lesions and

evident malformations of the heart that — thanks to the thorough studies and exact descriptions by Spitzer — now can be explained developmental-mechanically and classified logically in a clear and perspicuous system.

It is a good many years now since I wrote anything myself about malformations of the heart, and I shall not try tonight, without preparation, to recapitulate this system.

Spitzer based his work on thorough philogenetic and ontogenetic studies, according to which the development of the heart takes place through the turns and fusions which the primordial heart tube goes through, and on the theory about the anlage of a right aorta as well as a left. Under the developmental torsion, the left aortic anlage turns more and more over the area which is to become the left ventricle, while the right aortic anlage is suppressed. On defective torsion, however, the left aortic anlage may be suppressed, while the right aortic anlage develops so that the later aorta arises from the right ventricle, while the pulmonary artery apparently takes its origin in the left ventricle.

I should like to ask Dr. Tramsen whether the hyperplasia involved the right ventricle in any particular degree. For in cases of this kind, the left ventricle is often very small and indicated by a muscular ridge which shows where the interventricular septum normally would have arisen. These malformations often give stenosis of the site of departure of the aorta and hypoplastic aortic valves, increasing thus the work of the heart, with hyperplasia of the endocardium. The sites of departure of the coronary arteries and the location of the aortic valves and the topographical dimensions of the aortic bulb give some information about these questions.

It seems difficult to explain the fibrosis here described as resulting from an inflammatory process; it seems more likely to be a product of malformation.

L. Heerup: It is to be regretted that in this case no microscopic examination was made of the myocardium, blood vessels and valves. While it cannot be denied that the interpretation of the findings given here may be correct, it will be appropriate to point out that an entirely different explanation of the phenomena might be conceivable, namely: the child may have had a fetal endocarditis of the aortic valves with stenosis, impairment of the outflow of the blood from the left ventricle and, for this very reason, persistence of the ductus Botalli as a relief for the aortic ostium. From the aortic valves, small thrombotic fragments may have entered the coronary arteries, giving occlusion of some branches that resulted in fibrosis. Or the rheumatic (allergic) process may in itself have given obliterating vascular changes in the heart.

W. Munk mentioned that in 1940 he had published a case

of congenital aortic and mitral endocarditis in a child, 3 days old. The diagnosis was verified microscopically. The mother had never had scarlet fever, rheumatic fever, diphtheria or venereal disease. She had been perfectly well throughout the gestation, and the parturition and puerperium took a perfectly normal course without febrile phenomena.

Helge Tramsen: To Dr. Freudenthal: The changes demonstrated in the myocardium may hardly be conceived to represent a strictly developmental anomaly. The hypertrophy was most pronounced on the left side.

To Dr. Heerup: Of course it cannot be excluded with absolute certainty that the changes here observed may have developed on the basis of rheumatic infection, but this would not explain the mechanical hindrance to the coronary circulation. It seems more reasonable, therefore, to assume that the extensive myofibrosis may have been due to nutritional disturbances.

## DANSK PATOLOGFORENING 7. MØDE 9.12. 1942 I KØBENHAVN.

*The Seventh Meeting of the Danish Pathological Society,  
December 9, 1942.*

*Septième séance des pathologistes danois le 9 décembre 1942.*

*Siebente dänische Pathologentagung am 9. December 1942.*

J. Engelbreth-Holm: *On Inhibition of the Growth of Leukemic Cells.*\*)

A review is given of investigations into the influence of various agents on the development of spontaneous leukemia in an inbred mouse race. First an account is given of a great number of experiments in which treatment of the animals with yeast, inulin, cystein, potassium ferricyanide and tocoferol was found to have no influence on the development of leukemia in experiments with about 50 treated mice in each experiment and 50 control animals (sibs of the treated animals).

Then a review is given of experiments in which the animals were treated with intravenous injections of 9:10-dimethyl-1:2-benzanthracene in watery suspension. This treatment is found to inhibit the development of transplanted leukemia, and with a

---

\*) To be published in extenso by H. Eltorm and by S. Stamer in this journal.

dosage of 7.5 mg. it cured the disease in 5 animals. The same treatment had no effect in spontaneous cases of the disease.

In other experiments a study was made of the effect of a decrease in the body temperature — to about  $20^{\circ}$  for up to 20 hours — against manifest continuous leukemia. In these experiments the decrease in temperature has been demonstrated to bring about some severe degenerative changes in the cells in the leukemic infiltrations, whereas the normal cells remain unchanged. These changes go even so far as to complete disappearance of the leukemic infiltrations, but in every case the effect has proved to be merely temporary.

The results of these two series of experiments appear to lend support to the view that the leukemic cells are to be looked upon as defective cells; for otherwise the effect of the agency employed can hardly be understood.

#### Discussion:

Tage Kemp asked some questions about the technique in the transplantation of leukemia, as he thought it might not be possible entirely to compare the effect of heating and chilling of the cells.

He further asked how irritation conceivably might injure the cells to such an extent that they become malignant. He finally asked how the outcome had been in treatment with chilling for malignant tumors in man.

Svend Felding: Among these, highly interesting, experimental results, particular attention is to be paid to the effect of the chilling treatment of the leukemic infiltrations, as this appears to be of great biological significance. In keeping with my experiences from experiments on dogs, I should like to suggest some experiments in which the temperature of the mice is lowered in a somewhat lesser degree — for instance,  $6-8^{\circ}$  — by a puncture in the third ventricle, as this will give a more protracted chilling effect than may be obtained by cooling and inanition, which obviously are rather deleterious to the small animals. This treatment will probably be a little difficult technically, but by no means impracticable. But perhaps the mice will not tolerate it.

Johs. Clemmesen: As the experiments showed an effect of the carcinogenic substances on transplanted leucosis, while no effect could be ascertained from the same treatment in spontaneous leucosis, it would be interesting to learn whether any work had been published recently on the effect of carcinogenic substances on the reticulo-endothelial system. Presumably the difference in the reaction of the organism to spontaneous and transplanted leucosis had to be looked for in the reticulo-endothelial system;

and earlier investigations -- for instance by Lacassagne -- appeared to be suggestive of some effect of tar on the reticulo-endothelial system.

L. Heerup: It would be of interest to learn whether it might be possible to obtain some even better results by a combination of the 9:10-dimethyl-1:2-benzanthracene treatment *and* chilling.

As to the question about the correctness of the view that tumor cells are injured cells and *not* young cells, growing rapidly, it is to be emphasized that the greater susceptibility of the tumor cells to various forms of treatment and substances need *not* necessarily indicate that these cells are injured and hence more susceptible.

Children and young persons grow rapidly with strong and unrestrained manifestations of life, but they are also far more sensitive to toxic substances. In analogy hereto it seems conceivable that the tumor cells are young and *therefore* sensitive to the forms of treatment here tried out. Indeed, the term »primordial-cell leukemia« applied by Professor Engelbreth-Holm to the form of leukemia here investigated is more in keeping with a conception of the cells as developmentally young cells.

V. Friedenreich asked whether investigations had been reported on the tumor-inhibiting effect of several different hydrocarbons and, if so, any parallelism was found between the inhibitory effect and the carcinogenic effect.

J. Engelbreth-Holm: For the transplantation of leukemia we have employed subcutaneous injection of minced tumor tissue.

As to the question asked by Dr. Kemp -- whether an irritation will injure the cells so they become malignant -- and the mention made by Dr. Heerup of the same problem, it would be tempting to enter into a more thorough discussion of these important and interesting problems. Here, however, we have to be content to establish that every known carcinogenic action has proved to be injurious to the cells. As to particulars, I shall have to refer to a paper in Nord. Med, 3: 2669, 1939 and to the considerations concerning this question given in »Leukemia in Animals«, London 1942.

The suggestion made by Dr. Felding about lowering of the temperature by means of a puncture in the third ventricle is highly interesting, but I am afraid that the operation technically will prove too difficult to perform on such small animals as mice. The same applies to Dr. Heerup's suggestion about the two methods of treatment here employed, each of which is difficult to carry through.

Undoubtedly Dr. Clemmensen is right in assuming that the reticulo-endothelial system plays a role in the outcome of these

experiments. At present we have some experiments going on to investigate this very question more thoroughly. As far as I know, no experiments have been reported that were aimed directly at the effect of the carcinogenic substance on the reticulo-endothelial system.

H. Eltorm: To Dr. Kemp's question whether cancer patients have been treated with lowering of the body temperature, the so-called chilling therapy, I shall merely answer that such treatment, after Fay & Smith's method, has been given in some cases in the Radium Station, Copenhagen. Altogether 11 patients, suffering from various forms of cancer, have been treated in this way. The treatment aimed primarily to ascertain whether this therapy had any analgetic effect, and, further, whether it has any noticeable effect on the growth of the tumor. Of the 11 patients 6 died in connection with the treatment, but this fatal outcome cannot with certainty be ascribed to the treatment, as all the patients were in a very poor condition at the institution of the treatment. In a couple of the cases in which the treatment was carried through it had unquestionably an analgetic effect, and in a couple of other cases there appeared to be a noticeable diminution in the size of the tumor. In one of these cases the lesion was a reticulosarcoma of the sternum, in the other, a lymphatic leukemia for which the patient had been treated for several years with X-rays. In this case, there was a considerable diminution in the size of the lymph glands accompanied by a favorable effect in the blood picture. This treatment of cancer patients was given up on account of the risk involved and because the obtained results were rather questionable. Apart from these few remarks, I have to limit myself to refer those interested to an account of our experiences with this method of treatment in *Klin. Wehnschr.* 24: 641 and 661, 1942.

O. Wanschler: *Diagnosis of the Portio Vaginalis Cancer in its Precancerous Stage.*

After Hinselmann introduced into diagnostics the use of the colposcope it has been possible to demonstrate on the portio vaginalis superficial and to the naked eye invisible epithelial changes, several of which have proved histologically to be carcinomas in their incipient stages. The value of this method of examination has been further added to by Schiller's iodine test. By painting of the portio vaginalis uteri with Lugol's solution this test may show unstained, leukoplakic areas, a number of which on a histological examination disclose epithelial changes that are malignant or highly suspicious of malignancy.

Schiller's test not having been thoroughly tried in this country

we have undertaken to examine it further on a fairly large out-patient material.

We have made the test on altogether 1510 patients, and in 1151 cases we found nothing abnormal. On 17 of these latter patients biopsy was made, and the epithelium was found to be normal. In the cases in which there were leukoplakia-like decolorations of the epithelium of the portio vaginalis 244 biopsies were made. By far the greater number of these showed cervicitis or simple erosions. Only 30 cases displayed the following changes: 4 solid carcinoma, 8 pronounced precancerous changes, and 18 slightly atypical squamous epithelium or cornification, which cases were stated in the histological diagnosis to be suspicious of a precancerous change. On inspection with the naked eye only 5 out of these 30 cases could be called suspicious; 4 showed an apparently normal portio vaginalis; but on a microscopic examination they all showed malignant changes.

Thus among 1510 patients submitted to the Schiller-test there were found 8 cases of precancerous changes in the squamous epithelium of the portio vaginalis, i. e., in about  $\frac{1}{2}$  per cent of the cases; or among 2068 out-patients there were found 8 with precancerous changes, which means that by the method described above severe changes are disclosed in 4 per mille of those applying to a gynecological out-patient department.

The precancerous epithelial changes found through our examinations are characterized by absence of differentiation of the cells of the squamous epithelium with hyperplasia of the basocellular layers of cells, pronounced polymorphism of cells and nuclei, varying density of chromatin, and mitotic figures. Only in a single case was there found a slight invasion into the propria, and in another case isolated islands of carcinomatous cells in the propria.

Difficulties in the differential diagnosis are discussed and microphotographs of the observed changes are shown.

The questions of treatment are touched on, and early treatment is advocated, as observation for too long is thought to be risky.

#### Discussion:

Vesterdal Jørgensen: In principle I agree with Dr. Wanschsch. It has been my experience in some cases that changes of the type demonstrated in the first of the photos have subsequently developed into cancer.

I should like to ask the Cancer Register whether it wishes such cases notified as cancer or as precancerous changes.

P. N. Damm: Among the pathologists there appears still to be some divergence of opinion concerning the histological features of



precancerous changes. This makes it even more important to the clinician to what extent the histological changes may be dependent upon colpitic processes in the portio vaginalis as mentioned by Dr. Wanscher. If in these cases we may find a certain cellular polymorphism that may be suggestive of precancerous changes, this will undoubtedly happen also in cases involving erosions in a state of regeneration after local application of strongly irritating substances as silver nitrate, etc. In the clinic, therefore, we have adopted the rule never to give such treatment prior to a biopsy — in order to avoid this possibility of a mistaken diagnosis.

During pregnancy too, there is an increased cellular growth in the area of erosion that can be ascertained even macroscopically, as its appearance becomes considerably more granular and also elevated in relation to the surroundings — a change that is so characteristic that a commencing pregnancy often can be diagnosed on these features alone. As far as that goes, it will be appropriate to warn against an all too extensive employment of biopsy of the portio vaginalis during pregnancy, as, apart from the risk of infection, it may give rise to abortion.

Svend Petri: It is a good thing that the long-desired co-operation between the clinician and the pathologist finally has been established in the important field here concerned. I wish emphatically to advocate the view that the basocellular changes in the portio vaginalis under discussion 1) constitute a well-characterized, well-defined and unmistakable area of atypical epithelium which may hardly be mistaken for other forms of epithelial changes; 2) that these changes structurally are identical with the features of the most frequent form of carcinoma of the portio, merely without growth in the depth; and 3) that in a certain number of cases — according to the experiences of others as well as my own — these changes constitute direct precursors of basocellular carcinoma of the portio with invasive growth.

Originally we designated these changes as »atypical squamous epithelium« and suggested further observation of the patients. Subsequently we have gone on to use exclusively the designation »precancerous changes« in order to emphasize the existing possibility of development into unquestionable carcinoma.

We await with the greatest interest the future investigations into the absolute frequency of these epithelial changes — for the ascertainment of which the Schiller test undoubtedly will prove a most valuable adjuvant — and their subsequent fate, especially the percental frequency of their development into an invasive tumor.

Find Andersen: For the present we have to gather information and experiences, and in doing this we must avoid causing

any harm to the patients. The principle of the treatment has to be deliberated with equal consideration for the first-mentioned fact, that one feels yet somewhat uncertain about the diagnosis carcinoma in these cases, and for the latter fact that in gathering additional experiences concerning this question, we shoulder an extra heavy responsibility for these patients.

The operative treatment — amputation of the cervix or vaginal hysterectomy — has been recommended by German clinicians, but instances of recurrence have been observed in such cases. Furthermore, it has long been an established principle that cancer of the cervix ought to be treated radiologically and hence it seems unreasonable to deviate from this rule in a lesion as the one concerned here which indeed is of particular interest solely because of its suspicion of cancer. Finally, with the prevailing propaganda for radiological treatment it would be unjustifiable if the patient were to suffer a recurrence after operative treatment. The further observation and control of patients with pronounced precancerous changes must therefore be the task of the Radium Station. Indeed, as far as I know, it is the plan of the Radium Station to institute radium treatment of all patients over 40 years, while younger patients are kept under observation with quarterly gynecological examination and biopsy, so that radium treatment can be given at the first sign of invasion. On the other hand, patients with rather slight, beginning or doubtful changes may very well be under observation outside the Radium Station, to which they need be referred only if a subsequent biopsy shows progression in malignancy.

As to Dr. Damm's hesitation about biopsy in suspect erosion of the cervix during pregnancy, with my modest experiences I do not think this hesitation is properly founded. As biopsy in these cases involves but a very small specimen of quite superficial tissue, it certainly implies no risk to the normal course of the gestation; and there is no reason why such a biopsy should not be performed ambulatorily.

J. Engelbreth-Holm: It is a most important question that is taken up for discussion in Dr. Wanscher's paper, but I think the question can by no means be solved by the pathologist — something, I think, we all agree on. It is impossible by means of the microscope alone to decide whether these changes actually are precancerous. There is only one way to go, and that is to observe these patients and note how many of them eventually get cancer.

It is rather strange that in this discussion no mention has been made of the effect of estrine on the epithelium. For there can be no doubt that in particular this epithelium under hormonal

influence and possibly under the influence of other substances too, may present some features which very well may be mistaken for »precancerous«.

Like Dr. Heerup I doubt that it is justified to stamp all the changes here presented as precancerous. Presumably the first two or three are certain, but I question very much the alleged malignant nature of the latter specimens presented here.

Dr. Find Andersen's statement that lately he has observed 17 new cases lends support to the assumption that was suggested already by the report on the 6 precancerous cases in Dr. Wanscher's material, namely: that these figures are too high, that they are in conflict with the actual number of uterine cancers in the population.

O. Wanscher: I beg to express my appreciation of the remarks and views presented by the various participants in this discussion. Several have expressed the opinion that the changes here pointed out in the portio epithelium cannot with certainty be designated as manifestation of carcinoma and that treatment of the lesion therefore is not required at once while such patients should be under observation for a longer period. It cannot be excluded, I admit, that the changes here described *may* persist for a considerable length of time without progressing, and theoretically it may even be possible that some of these changes may undergo retrogression. But our studies do not pretend to have solved these questions. It is our hope, however, that further investigation on a broader basis and covering a longer period will be able to contribute to the solution of the problem, and I trust that the cooperation with the clinicians in this field will prove profitable in the future.

Rich. Hammen: *Vital Nuclear Staining.*

Previous investigators do not agree as to the possibility of vital staining of living nuclei.

The writer thinks he has been able to obtain a vital staining of living nuclei of human sperm cells with various electro-positive dyes.

Employment of electro-negative dyes gives staining of apparently dead nuclei.

These findings thus appear to imply the possibility of a classification of sperm cells after their staining properties.

(The paper will be published in extenso in »Protoplasma«.)

No discussion.

# INDEX

VOL. XX FASC. 1—4.

ANTIANAEMISCHER STOFFE DES MAGENS, EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ENTSTEHUNG DER ANAEMIE BEI THROMBOSEN IM PFORTADERGEBIET UND DIE BEDEUTUNG — —, von <i>Ernst Wollheim</i> .....	372
ANTIGEN AND THE CORRESPONDING ANTIBODY WITHIN THE SAME ORGANISM, CONTRIBUTION TO THE DISCUSSION ON THE PRESENCE OF — —, by <i>G. Hartmann</i> and <i>V. Friedenreich</i> .....	45
ANTIGENIC RELATIONSHIP BETWEEN MICROCOCCUS CATARRHALIS AND GONOCOCCI, DEMONSTRATION OF — —, by <i>Alice Reyn</i> .....	257
Blutdruckschreibung am Menschen, Methodik und Ergebnisse fortlaufender — —, von <i>R. Wagner</i> .....	199
Blutverlust Blutersatz, von <i>Gerd Habelmann</i> .....	423
CATGUT. II, UNTERSUCHUNGEN ÜBER — —, von <i>Henry M. Christensen</i> und <i>Poul V. Marcussen</i> .....	450
COLIFLORA DES GESUNDEN MENSCHEN, ÜBER DIE — —, von <i>F. Kauffmann</i> und <i>Beate Perch</i> .....	201
DANSK PATOLOGFORENING 4. MØDE 10/4 1942 I KØBENHAVN .....	416
DANSK PATOLOGFORENING 5. MØDE 16/9 1942 I KØBENHAVN .....	791
DANSK PATOLOGFORENING 6. MØDE 14/10 1942 I KØBENHAVN .....	795
DANSK PATOLOGFORENING 7. MØDE 9/12 1942 I KØBENHAVN .....	801
DIPHTHERIA ANTITOXIN, HEREDITARY DIFFERENCES IN THE CAPACITY OF GUINEA-PIGS FOR THE PRODUCTION OF — —, by <i>Inga Fjord Scheibel</i> .....	464

DOMINICI-METHODE ZUR ELEKTIVEN FÄRBUNG DER EOSINOPHILEN ZELLEN IM HYPOPHYSENVORDERLAPPEN, EINE MODIFIZIERTE — —, von <i>P. Fonss-Bech</i>	560
ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE CAUSING A FATAL MENINGEAL INFECTION IN A HUMAN BEING, by <i>Th. Thjötta</i>	597
FAT-EMBOLISM, HISTOLOGICAL CHANGES IN THE KIDNEYS IN —, by <i>Erik Waaler</i>	329
FERMENTATION MUTATIVE DES BACTÉRIES, RECHERCHES SUR LA — —, par <i>Martin Kristensen</i>	530
FUSOBACTERIUM, ON THE MOTILITY OF —, by <i>Johs. Boc</i>	573
FUSOBACTERIUM AND THE ACCOMPANYING SPIROCHETES, ON THE RELATION BETWEEN — —, by <i>Johs. Boc and Jon Jonsen</i>	585
GONADOTROPIC HORMONES IN THE MALE ORGANISM, EFFECT OF — —, by <i>Tage Kemp, Kaj Pedersen-Bjergaard and G. Bollerup Madsen</i>	633
GONOKOKKENKULTUR FÜR DIAGNOSE UND BEHANDLUNG DER GONORRHÖE, DIE BEDEUTUNG DER — —, von <i>Gösta Hagerman</i>	495
GRANULOZYTEN, ÜBER EINIGE NEKROBIOTISCHE ERSCHEINUNGEN BEI DEN NEUTROPHILEN UND EOSINOPHILEN —, von <i>Ivar Wallgren</i>	776
HYPERPARATHYROIDISM, ACUTE FATAL —, by <i>Jan Mellgren</i>	693
KÖRPERANTIGENE DER COLI-BAKTERIEN, ÜBER NEUE THERMOLABILE — —, von <i>F. Kauffmann</i>	21
LEUKEMIA IN MICE FROM LOWERING OF THE BODY TEMPERATURE, EFFECT ON — —, by <i>J. Engelbreth-Holm and Helge Ellorm</i>	346
LEUKEMIA, INFLUENCE OF CARCINOGENIC HYDROCARBON UPON TRANSPLANTED —, by <i>S. Stamer and J. Engelbreth-Holm</i>	360
Leukemia in Animals, by <i>Julius Engelbreth-Holm</i>	630
(“MARFANIL”). EFFECT OF p-(AMINOMETHYL)-BENZENE-SULFONAMIDE —, by <i>Kai Schmidt</i>	563
MUCIN-INFEKTIONEN ZUR UNTERSUCHUNG VON SERUM GEGEN GIFTARME DYSENTERIE-BAKTERIEN, ANWENDUNG VON — —, von <i>V. Sindbjerg-Hansen</i>	442
MUNDSPIROCHÄTEN, EIN VEREINFACHTES VERFAHREN ZUR REINZÜCHTUNG VON —, von <i>Harry S. Klein</i>	335
NEOPLASTIC CELLS IN THE SPUTUM, ON THE DEMONSTRATION OF — —, by <i>H. H. Wandall</i>	485
OESTROGENEN STOFFE, DIE NATÜRLICH VORKOMMEN-	

DEN UND DIE SYNTHETISCH HERGESTELLTEN — —, von <i>Tage Temp</i> und <i>Kaj Pedersen-Bjergaard</i> .....	552
OLIGODYNAMIE BEI DEN PYRIDIN-, CHINOLIN- UND ARKIDINABKÖMMLINGEN, ZUR — —, von <i>Otto Ornstein</i> .....	315
OSTEOSCLEROTIC ANEMIA IN A BOY OF 17 MONTHS, by <i>Bent Andersen</i> and <i>Tage Lund</i> .....	425
PEMPHIGUS STAPHYLOCOCCI, STUDIES ON THE SPECI- FICITY OF — —, by <i>Else Krag Andersen</i> .....	242
PHAGOCYTTIC POWER OF LEUCOCYTES, ON THE DETER- MINATION OF THE — —, by <i>A. Hald</i> , <i>M. Jersild</i> and <i>G. Rasch</i> .....	64
PLASMA CELLS AS ANTIBODY PRODUCERS, EXPERI- MENTAL STUDIES ON THE ROLE OF — —, by <i>M. Bjorne- boe</i> and <i>H. Gormsen</i> .....	649
PNEUMONIA AND PNEUMOCOCCUS CARRIERS IN SAUDA, AN ISOLATED INDUSTRIAL COMMUNITY IN NORWAY, BACTERIOLOGICAL INVESTIGATIONS ON — —, by <i>Jul. Riddervold</i> and <i>Knut Halvorsen</i> .....	272
"RATIN"-KULTUREN, EINIGE IMMUNISIERUNGSVERSU- CHE MIT — —, von <i>L. Bahr</i> .....	299
Réticulopathies et le système réticulo-histiocytaire, Un nouvel aspect de la médecine tissulaire: Les — —, par <i>Pierre Cazal</i> .....	629
SALMONELLA-GRUPPE, ZUR DEFINITION DER — —, von <i>F. Kauffmann</i> .....	240
SALMONELLATYP (S. SUNDSVALL) IN SCHWEDEN NACH- GEWIESEN, EIN NEUER — —, von <i>G. Olin</i> und <i>K. Alin</i> ..	607
SERUM PROTEINS DURING IMMUNIZATION, by <i>M. Bjorne- boe</i> .....	221
STERILE ALCOHOL PREPARED BY AUTOCLAVING, <i>Henry M. Christensen</i> and <i>Poul V. Marcussen</i> .....	735
SULPHAMETHYLTHIAZOLE ON NORMAL AND TUBER- CULOUS GUINEA-PIGS, STUDIES ON THE EFFECT OF — —, by <i>Jens Bing</i> .....	743
SULFONAMID-PRÄPARATEN AUF SALMONELLA-, DYSEN- TERIE- UND COLI-BAKTERIEN, ÜBER DIE WIRKUNG VON — —, von <i>F. Kauffmann</i> und <i>K. Schmith</i> .....	1
Topografiska Anatomi, Människokroppens — —, von <i>Ivar Bro- man</i> .....	199
TUBERKULOSEPROPHYLAXE UND -THERAPIE IN EX- PERIMENTELLER BELEUCHTUNG, von <i>K. A. Jensen</i> und <i>Inger Kiær</i> .....	133
ULCUSGASTRITIS, BEITRAG ZUR FRAGE DER GEOGRA- PHISCHEN VARIATIONEN IM ANATOMISCHEN BILDE DER — —, von <i>Nils Ringertz</i> .....	615

WASSERREINIGUNG. (I), EXPERIMENTELLE BEITRÄGE ZUR OLIGODYNAMISCHEN WIRKUNG MIT BESONDERER RÜCKSICHT AUF DIE —, von <i>Otto Ornstein</i> .....	86
ZELLE UNTER NORMALEN UND PATHOLOGISCHEN VERHÄLTNISSEN, BEOBACHTUNGEN ÜBER DEN FEINEREN BAU UND DIE FUNKTION DER MENSCHLICHEN — —, von <i>Ivar Wallgren</i> .....	754
<hr/>	
<i>Alin, K. und Olin, G.</i> : Ein neuer Salmonellatyp (S. Sundsvall) in Schweden nachgewiesen .....	607
<i>Andersen, Bent and Lund, Tage</i> : Osteosclerotic anemia in a boy of 17 months .....	425
<i>Andersen, Else Krag</i> : Studies on the specificity of pemphigus staphylococci .....	242
<i>Bahr, L.</i> : Einige Immunisierungsversuche mit »Ratin«-Kulturen	299
<i>Bing, Jens</i> : Studies on the effect of sulphamethylthiazole on normal and tuberculous guinea-pigs .....	743
<i>Bjørneboe, M.</i> : Serum proteins during immunization .....	221
<i>Bjørneboe, M. and Gormsen, H.</i> : Experimental studies on the role of plasma cells as antibody producers .....	649
<i>Bøe, Johs.</i> : On the motility of fusobacterium .....	573
<i>Bøe, Johs. and Jonsen, Jon</i> : On the relation between fusobac- terium and the accompanying spirochetes .....	585
<i>Christensen, Henry M. und Marcussen, Poul V.</i> : Untersuchun- gen über Catgut. II .....	450
<i>Christensen, Henry M. and Marcussen, Poul V.</i> : Sterile alcohol prepared by autoclaving .....	735
Dansk Patologforenings 4. Møde 10/4 1942 i København .....	416
Dansk Patologforenings 5. Møde 16/9 1942 i København .....	791
Dansk Patologforenings 6. Møde 14/10 1942 i København .....	795
Dansk Patologforenings 7. Møde 9/12 1942 i København .....	801
<i>Eltorm, Helge and Engelbreth-Holm, J.</i> : Effect on leukemia in mice from lowering of the body temperature .....	346
<i>Engelbreth-Holm, J. and Eltorm, Helge</i> : Effect on leukemia in mice from lowering of the body temperature .....	346
<i>Engelbreth-Holm, J. and Stamer, S.</i> : Influence of carcinogenic hydrocarbon upon transplanted leukemia .....	360
<i>Friedenreich, V. and Hartmann, G.</i> : Contribution to the discus- sion on the presence of antigen and the corresponding anti- body within the same organism .....	45
<i>Fonss-Bech, P.</i> : Eine modifizierte Dominici-Methode zur elek- tiven Färbung der eosinophilen Zellen im Hypophysenvor- derlappen .....	560

<i>Gormsen, H. and Bjorneboe, M.</i> : Experimental studies on the role of plasma cells as antibody producers .....	649
<i>Hagerman, Gösta</i> : Die Bedeutung der Gonokokkenkultur für Diagnose und Behandlung der Gonorrhöe .....	495
<i>Hald, A., Jersild, M. and Rasch, G.</i> : On the determination of the phagocytic power of leucocytes .....	64
<i>Halvorsen, Knut and Riddervold, Jul.</i> : Bacteriological investigations on pneumonia and pneumococcus carriers in Sauda, an isolated industrial community in Norway .....	272
<i>Hartmann, G. and Friedenreich, V.</i> : Contribution to the discussion on the presence of antigen and the corresponding antibody within the same organism .....	45
<i>Jensen, K. A. und Kier, Inger</i> : Tuberkuloseprophylaxe und -therapie in experimenteller Beleuchtung. I .....	133
<i>Jersild, M., Rasch, G. and Hald, A.</i> : On the determination of the phagocytic power of leucocytes .....	64
<i>Jonsen, Jön and Boe, Johs.</i> : On the relation between fusobacterium and the accompanying spirochetes .....	585
<i>Kauffmann, F. und Schmith, K.</i> : Über die Wirkung von Sulfonamid-Präparaten auf Salmonella-, Dysenterie- und Coli-Bakterien .....	1
<i>Kauffmann, F.</i> : Über neue thermolabile Körper-Antigene der Coli-Bakterien .....	21
<i>Kauffmann, F. und Perch, Beate</i> : Über die Coliflora des gesunden Menschen .....	201
<i>Kauffmann, F.</i> : Zur Definition der Salmonella-Gruppe .....	240
<i>Kemp, Tage und Pedersen-Bjergaard, Kaj</i> : Die natürlich vorkommenden und die synthetisch hergestellten oestrogenen Stoffe .....	552
<i>Kemp, Tage, Pedersen-Bjergaard, Kaj and Madsen, G. Bollerup</i> : Effect of gonadotropic hormones in the male organism ..	633
<i>Kier, Inger und Jensen, K. A.</i> : Tuberkuloseprophylaxe und -therapie in experimenteller Beleuchtung. I .....	133
<i>Klein, Harry S.</i> : Ein vereinfachtes Verfahren zur Reinzüchtung von Mundspirochäten .....	335
<i>Kristensen, Martin</i> : Recherches sur la fermentation mutative des bactéries .....	530
<i>Lund, Tage and Andersen, Bent</i> : Osteosclerotic anemia in a boy of 17 months .....	425
<i>Madsen, G. Bollerup, Kemp, Tage and Pedersen-Bjergaard, Kaj</i> : Effect of gonadotrophic hormones in the male organism ..	633
<i>Marcussen, Poul V. und Christensen, Henry M.</i> : Untersuchungen über Catgut. II .....	450



<i>Marcussen, Poul V. and Christensen, Henry M.: Sterile alcohol prepared by autoclaving</i> .....	735
<i>Mellgren, Jan: Acute fatal hyperparathyroidism</i> .....	693
<i>Olin, G. und Alin, K.: Ein neuer Salmonellatyp (S. Sundsvall) in Schweden nachgewiesen</i> .....	607
<i>Ornstein, Otto: Experimentelle Beiträge zur oligodynamischen Wirkung mit besonderer Rücksicht auf die Wasserreinigung. I</i> .....	86
<i>Ornstein, Otto: Zur Oligodynamie bei den Pyridin-, Chinolin- und Akridinabkömmlingen</i> .....	315
<i>Pedersen-Bjergaard, Kaj und Kemp, Tage: Die natürliche vorkommenden und die synthetisch hergestellten oestrogenen Stoffe</i> .....	552
<i>Pedersen-Bjergaard, Kaj, Madsen, G. Bollerup und Kemp, Tage: Effect of gonadotropic hormones in the male organism</i> ..	633
<i>Perch, Beate und Kauffmann, F.: Über die Coliflora des gesunden Menschen</i> .....	201
<i>Rasch, G., Hald, A. and Jersild, M.: On the determination of the phagocytic power of leucocytes</i> .....	64
<i>Reyn, Alice: Demonstration of antigenic relationship between micrococcus catarrhalis and gonococci</i> .....	257
<i>Riddervold, Jul. and Halvorsen, Knut: Bacteriological investigations on pneumonia and pneumococcus carriers in Sauda, an isolated industrial community in Norway</i> .....	272
<i>Ringertz, Nils: Beitrag zur Frage der geographischen Variationen im anatomischen Bilde der Ulcusgastritis</i> .....	615
<i>Scheibel, Inga Fjord: Hereditary differences in the capacity of guinea-pigs for the production of diphtheria antitoxin</i> ....	464
<i>Schmith, K. und Kaufmann, F.: Über die Wirkung von Sulfonamid-Präparaten auf Salmonella-, Dysenterie- und Coli-Bakterien</i> .....	1
<i>Schmith, Kai: Effect of p-(aminomethyl)-benzenesulfonamide ("Marfanil")</i> .....	563
<i>Sindbjerg-Hansen, V.: Anwendung von Mucin-Infektionen zur Untersuchung von Serum gegen giftarme Dysenterie-Bakterien</i> .....	442
<i>Stamer, S. and Engelbreth-Holm, J.: Influence of carcinogenic hydrocarbon upon transplanted leukemia</i> .....	360
<i>Thjötta, Th.: Erysipelothrix rhusiopathiae causing a fatal meningeal infection in a human being</i> .....	597
<i>Waler, Erik: Histological changes in the kidneys in fat-embolism</i> .....	329
<i>Wallgren, Ivar: Beobachtungen über den feineren Bau und die Funktion der menschlichen Zelle unter normalen und pathologischen Verhältnissen</i> .....	754

<i>Wallgren, Ivar</i> : Über einige nekrobiotische Erscheinungen bei den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten .....	776
<i>Wandall, H. H.</i> : On the demonstration of neoplastic cells in the sputum .....	485
<i>Wollheim, Ernst</i> : Experimentelle Untersuchungen über die Entstehung der Anaemien bei Thrombosen im Pfortadergebiet und die Bedeutung antianaemischer Stoffe des Magens ....	372

---

## SUPPLEMENTA

- Supplementum XLVI: *Gösta Hagerman*: Studien zur Chemoresistenz der Gonokokken. 1942.
- Supplementum XLVII: *S. Stamer*: Effect of a carcinogenic hydrocarbon on manifest malignant tumors in mice. 1943.
- Supplementum XLVIII: *Hjalmar Sjövall*: The genesis of skull and brain injuries. 1943.
- Supplementum XLIX: *Erik Andreassen*: Studies on the thymolymphatic system. 1943.
- Supplementum L: *Gunnar Norlin*: On the growth and toxin production of the diphtheria bacillus. 1943.